

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Efeito cardioprotetor de *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke em um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos**

**KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO**

**Dourados - MS  
2023**

KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO

**Efeito cardioprotetor de *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke em um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos**

Área do CNPq: Etnofarmacologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

Dourados - MS  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M843e Moreno, Karyne Garcia Tafarelo

Efeito cardioprotetor de *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke em um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos [recurso eletrônico] / Karyne Garcia Tafarelo Moreno. -- 2023.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Arquimedes Gasparotto Junior.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Hipertensão arterial sistêmica. 2. Dislipidemia. 3. Aterosclerose. 4. Burrito. I. Gasparotto Junior, Arquimedes . II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos vinte e quatro dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada **"Validação de um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos e avaliação do efeito cardioprotetor de *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke"**, apresentada pela doutoranda Karyne Garcia Tafarelo Moreno, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros/UFGD (membro titular interno), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francislaine Aparecida dos Reis Lívero/UFPR (membro titular externo), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monique Assis de Vasconcelos Barros/UFGD (membro titular externo), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Priscila de Souza/UNIVALI (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada Aprovada. A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 24 de outubro de 2023.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior  
Presidente/orientador

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros  
Membro Titular Interno  
(Participação Remota)

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francislaine Aparecida dos Reis  
Lívero  
Membro Titular Externo  
(Participação Remota)

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monique Assis de Vasconcelos  
Barros  
Membro Titular Externo  
(Participação Remota)

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Priscila de Souza  
Membro Titular Externo  
(Participação Remota)

**(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)**

**ATA HOMOLOGADA EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, PELA PROPP/ UFGD.**

## DEDICATÓRIA

Ao meu vô Zé (*in memoriam*),  
por muitas vezes nos ter amado  
além do que merecíamos. E à  
minha família, por serem a  
morada da minha alegria.

## AGRADECIMENTO(S)

A Deus, por me sustentar, capacitar e dar-me a oportunidade de executar esse trabalho; sabendo que muito pouco sou, e que menos ainda seria sem a Sua presença.

Aos meus pais, Tercio e Erica, que construíram a vida em prol da educação de seus filhos e que nos ensinaram valores que nenhuma universidade no mundo seria capaz de ensinar com tanta maestria. Obrigada por nunca renunciarem àquilo que sonharam para nós. Ao meu irmão, Haran, pelo companheirismo e cumplicidade de sempre. E aos meus avós, Zaira, Neuza, José (*in memoriam*), Francisco e Miguel (*in memoriam*) por todo o doce amor e cuidado que têm ou tiveram com a minha vida.

Ao meu marido e melhor amigo, Carlos Henrique, por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma, e por me amar, mesmo em dias ruins. Aos meus amigos, por alegraram meus dias e serem capazes de incentivar e acreditar em mim de uma forma que eu mesma não poderia fazer.

Aos meus professores, desde aqueles me alfabetizaram em uma escola rural sem energia elétrica no interior de Rondônia, até os mestres e doutores da universidade que, ao me inspirar, despertaram em mim o amor pela docência. Em especial agradeço ao meu orientador, professor Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, por não medir esforços para garantir as melhores condições para seus alunos, por sempre ensinar com respeito e pela paciência sem medidas. Seus ensinamentos nunca serão esquecidos.

À equipe do LaFAC, esse trabalho não seria possível sem cada um de vocês, obrigada por me ensinarem e me ajudarem quando mais precisei, obrigada pela parceria, pela dedicação incansável, pela amizade, pelas risadas, pelos bons vinhos e por não desistirem jamais. Em especial à Aline, por sua amizade e companheirismo inestimáveis. A todos que ajudaram direta ou indiretamente em alguma das etapas de execuções dos experimentos: Gabriela, Luana, Luciane, Cilmara, Larissa, Kelly, Mariana, Gustavo, Fábio, Clara, Bethânia, Patrícia, Katiana, Lislaine, Thiago, Rhanany, Profa. Dra. Ariany, Prof. Dr. Roosevelt, Profa. Dra. Denise, e aos técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde. Que a nossa amizade permaneça!

Aos órgãos de fomento CAPES, Fundect e CNPq, por tornarem esse doutorado possível. À Faculdade de Ciências da Saúde e à Universidade Federal da Grande Dourados que tem sido minha segunda casa desde 2013, onde me encontrei como profissional e onde vislumbrei possibilidades inimagináveis. Hoje, o mundo é muito maior do que me parecera antes.

## EPÍGRAFE

Experiência é o nome que damos aos nossos erros.  
(Oscar Wild)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – <i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke. Planta em habitat. | 36 |
|------------------------------------------------------------------------------|----|



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|          |                                                                                     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DCNT     | Doenças Crônicas Não Transmissíveis                                                 |
| DCV      | Doenças Cardiovasculares                                                            |
| HAS      | Hipertensão Arterial Sistêmica                                                      |
| PAS      | Pressão Arterial Sistólica                                                          |
| PAD      | Pressão Arterial Diastólica                                                         |
| LC-MS    | Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas                           |
| LDL      | Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)                           |
| LDL-C    | Low Density Lipoprotein Cholesterol (Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade) |
| HDL      | High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)                           |
| HDL-C    | High Density Lipoprotein Cholesterol (Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade) |
| AVC      | Acidente Vascular Cerebral                                                          |
| IC       | Insuficiência Cardíaca                                                              |
| COVID-19 | Coronavírus 2019                                                                    |
| IAM      | Infarto Agudo do Miocárdio                                                          |
| MET      | Metabolic Equivalent Task (Unidades Metabólica Equivalente)                         |
| apoB     | Apolipoproteína B                                                                   |
| IMC      | Índice de Massa Corporal                                                            |
| SHR      | Spontaneously Hypertensive rat (Rato Espontaneamente Hipertenso)                    |
| 2K1C     | 2 Kidneys – 1 Clip (2 rins – 1 clipe)                                               |
| CK-MB    | Creatina Quinase-MB                                                                 |
| cTNT     | Troponina T Cardíaca                                                                |

## **Efeito cardioprotetor de *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke em um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos**

### **RESUMO**

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortes entre as doenças crônicas não transmissíveis em todo o mundo. Existem fatores de risco que propiciam um aumento na ocorrência e/ou agravamento das DCV, estes, incluem a nutrição não saudável, inatividade física, dislipidemia, hiperglicemia, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), entre outros. Os modelos experimentais, especialmente envolvendo roedores, são amplamente difundidos nas pesquisas pré-clínicas, para a identificação de novos agentes farmacológicos relacionados ao sistema cardiovascular. Entre essas pesquisas, destacam-se aquelas originárias de relatos de uso popular e tradicional de plantas medicinais. A *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke, popularmente conhecida como “burrito”, é usada para tratar diferentes distúrbios do sistema cardiovascular. Dito isto, o objetivo geral deste trabalho foi validar um modelo pré-clínico de doença cardíaca induzido por múltiplos fatores de risco em ratos (Etapa 1) e avaliar o efeito cardioprotetor do óleo essencial de *A. polystachya* (Etapa 2). Para a etapa 1 foi desenvolvido um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular que associa HAS, hipotireoidismo e dislipidemia. Dois modelos de hipertensão foram usados: hipertensão renovascular (2 rins – 1 clip (2 kidneys – 1 clip (2K1C))) e ratos espontaneamente hipertensos (Spontaneously Hypertensive rat (SHR)). O grupo naïve foi composto por ratos normotensos. Doze semanas após cirurgia para induzir hipertensão renovascular, os ratos dos grupos 2K1C e SHR foram submetidos a tireoidectomia. Após três dias de recuperação pós-operatória, a dieta hiperlipídica foi então implementada por seis semanas. Função renal, marcadores bioquímicos, perfil eletrocardiográfico, pressão arterial, reatividade vascular de leito mesentérico, histopatologia e morfometria foram investigados em amostras de coração, rim, fígado, artérias subclávia e carótida. Ambos os modelos experimentais induziram dislipidemia, comprometimento da função renal e esteatose hepática, acompanhados de níveis elevados de diferentes marcadores inflamatórios séricos e estresse oxidativo. Essas alterações promoveram danos nos órgãos-alvo em todos os ratos hipertensos. Tais achados corroboram uma alternativa viável de modelo que envolve múltiplos fatores de risco cardiovascular e se assemelha a condições evidenciadas em humanos, principalmente em se tratando dos SHR, que exibiram alterações fisiopatológicas mais severas. Para a etapa 2, o óleo essencial das folhas de *A. polystachya* (EOAP) foi extraído. Foi avaliada a toxicidade aguda do EOAP em 10 ratas fêmeas da linhagem Wistar, divididas igualmente em dois grupos, controle (n = 5) e 2000 mg/kg (n =

5). Já no ensaio farmacológico, os animais foram randomizados e divididos em seis grupos: cinco grupos de animais SHR (n = 8) e um grupo de animais normotensos (naïve; n = 8). Os animais SHR foram submetidos à tireoidectomia para indução do hipotireoidismo. Os animais hipertensos foram divididos entre os grupos: EOAP dose 1 (1,47 mg/kg); EOAP dose 2 (4,40 mg/kg); EOAP dose 3 (13,20 mg/kg); controle negativo (veículo) e controle positivo (rosuvastatina, 5 mg/kg), todos tratados oralmente uma vez ao dia por seis semanas. Concomitantemente ao tratamento, foi implementada uma dieta hiperlipídica para todos os grupos, exceto o naïve (dieta padrão). Após 6 semanas, a função renal, marcadores bioquímicos, perfil eletrocardiográfico, pressão arterial, reatividade vascular do leito mesentérico, histopatologia e morfometria de amostras de órgãos foram investigados. Os resultados obtidos sugerem que o EOAP não promoveu sinais de toxicidade e preveniu as alterações renais, eletrocardiográficas e hemodinâmicas, mantendo níveis de pressão sistólica semelhantes aos encontrados nos animais naïve. Pode-se concluir que o modelo experimental que associa HAS, dislipidemia e hipotireoidismo, apresenta-se como uma alternativa eficiente para mimetizar alterações fisiopatológicas, bioquímicas e histopatológicas presentes em um quadro de múltiplos fatores de risco cardiovascular. Além disso, foi possível evidenciar o efeito cardioprotetor do EOAP em um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular.

**Palavras-chave:** Hipertensão Arterial Sistêmica. Dislipidemia. Aterosclerose. Burrito.

## **Cardioprotective effect of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke in a multiple cardiovascular risk factors model in rats**

### ***ABSTRACT***

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of death among chronic noncommunicable diseases worldwide. There are risk factors that lead to an increase in the occurrence and/or aggravation of CVD, these include unhealthy nutrition, physical inactivity, dyslipidemia, hyperglycemia, obesity, hypertension, among others. Experimental models are widely disseminated in preclinical research, for the identification of new pharmacological potentials related to the cardiovascular system, mainly using rodents. Among these studies, those originating from reports of popular and traditional use of medicinal plants stand out. *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke, popularly known as “burrito”, is used to treat different disorders of the cardiovascular system. Therefore, the general objective of the present work was to validate a preclinical model of multiple cardiovascular risk factors in rats (Step 1) and to evaluate the cardioprotective effect of the essential oil from *A. polystachya* (Step 2). For step 1, a model of multiple cardiovascular risk factors that associates hypertension, hypothyroidism and dyslipidemia was developed. Two models of hypertension were used: renovascular hypertension (2 kidneys – 1 clip (2K1C)) and spontaneously hypertensive rats (SHR). The naïve group was composed of normotensive rats. Twelve weeks after surgery to induce renovascular hypertension, rats in the 2K1C and SHR groups underwent thyroidectomy. The high-fat diet was then implemented for 6 weeks. Renal function, biochemical markers, electrocardiographic profile, blood pressure, vascular reactivity of the mesenteric bed, histopathology and morphometry were investigated in samples from the heart, kidney, liver, subclavian and carotid arteries. Both experimental models induced dyslipidemia, impaired renal function and hepatic steatosis, accompanied by increase in levels of different serum inflammatory markers and oxidative stress. These changes promoted target organ damage in all hypertensive rats. The data support a viable alternative model that involves multiple cardiovascular risk factors and resembles evidenced conditions in human, especially in the case of SHR, which exhibited more severe pathophysiological changes. For step 2, essential oil from *A. polystachya* leaves (EOAP) was extracted. The acute toxicity of EOAP in 10 female *Wistar* rats, equally divided into two groups, control (n = 5) and 2000 mg/kg (n = 5). In the pharmacological assay, animals were randomized and divided into six groups: five groups of SHR animals (n = 8) and one group of normotensive animals (naïve; n = 8). SHR animals underwent thyroidectomy to induce

hypothyroidism. Hypertensive animals were divided into groups: EOAP dose 1 (1.47 mg/kg); EOAP dose 2 (4.40 mg/kg); EOAP dose 3 (13.20 mg/kg); negative control (vehicle) and positive control (rosuvastatin; 5 mg/kg) all treated orally once daily for six weeks. Concomitantly with the treatment, a high-fat diet was implemented for all groups, except for the naïve (standard diet). After 6 weeks, renal function, biochemical markers, electrocardiographic profile, blood pressure, vascular reactivity of the mesenteric bed, histopathology and morphometry of organ samples were investigated. The results obtained suggest that EOAP did not promote signs of toxicity and prevented renal, electrocardiographic and hemodynamic alterations, maintaining systolic pressure levels similar to those found in naïve animals. It can be concluded that the experimental model that associates hypertension, dyslipidemia and hypothyroidism presents itself as an efficient alternative to mimic pathophysiological, biochemical and histopathological changes present in a context of multiple cardiovascular risk factors. Furthermore, it was possible to demonstrate the cardioprotective effect of EOAP in a model of multiple cardiovascular risk factors.

**Keywords:** Hypertension. Dyslipidemia. Atherosclerosis. Burrito.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 INTRODUÇÃO                                                                                                                                                                                   | 14  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA                                                                                                                                                                        | 15  |
| 2.1 Doenças cardiovasculares                                                                                                                                                                   | 15  |
| 2.2 Fatores de risco cardiovascular                                                                                                                                                            | 16  |
| 2.2.1 Nutrição não saudável                                                                                                                                                                    | 19  |
| 2.2.2 Inatividade física                                                                                                                                                                       | 22  |
| 2.2.3 Dislipidemia                                                                                                                                                                             | 23  |
| 2.2.4 Hiperglicemia                                                                                                                                                                            | 25  |
| 2.2.5 Obesidade                                                                                                                                                                                | 26  |
| 2.2.6 Hipertensão arterial sistêmica                                                                                                                                                           | 28  |
| 2.3 Modelos experimentais para o estudo das doenças cardiovasculares                                                                                                                           | 29  |
| 2.3.1 Modelos experimentais para o estudo de fatores de risco cardiovascular em roedores                                                                                                       | 31  |
| 2.4 Plantas medicinais                                                                                                                                                                         | 33  |
| 2.5 <i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke                                                                                                                                              | 35  |
| 3 OBJETIVOS                                                                                                                                                                                    | 39  |
| 4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                                                                                                                                                   | 41  |
| 5 APÊNDICES                                                                                                                                                                                    | 48  |
| 5.1 Artigo 1: A New Approach for the Development of Multiple Cardiovascular Risk Factors in Two Rat Models of Hypertension                                                                     | 49  |
| 5.2 Artigo 2: Effects of essential oil of <i>Aloysia polystachya</i> (Griseb) Moldenke on a multiple cardiovascular risk factors model in rats                                                 | 63  |
| 5.3 Capítulo de livro: Ka'á Jaguá ( <i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae)): From Traditional Use to Pharmacological Investigations in Relation to Cardiovascular Disease | 93  |
| 5.4 Artigo 3: Evidence of the Cardioprotective Effects of <i>Aloysia polystachya</i> in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats                                                    | 99  |
| 6 CONCLUSÕES                                                                                                                                                                                   | 104 |
| 7 ANEXOS                                                                                                                                                                                       | 105 |
| 7.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)                                                                                                                                                        | 106 |

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) foram as principais causas de mortes em 2017, contribuindo com 73,4% do total. As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortes entre as DCNT em todo o mundo, correspondendo a 17,8 milhões de mortes estimadas, atingindo uma prevalência de 523 milhões (ROTH et al., 2018; ROTH et al., 2020). Existem fatores de risco que propiciam um aumento na ocorrência e/ou agravamento das DCV, estes, incluem a nutrição não saudável, inatividade física, dislipidemia, hiperglicemia, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diferenças sexuais e de raça/etnia, trombose, tabagismo, disfunção renal e hipercolesterolemia genética/familiar (ARNETT et al., 2019).

Uma abordagem de cuidado de saúde que identifique previamente os fatores de risco garante um manejo seguro do paciente, antecipadamente às complicações cardiovasculares mais relevantes (BAYS et al., 2021). Para exemplificar, homens e mulheres aos 50 anos na ausência de fatores de risco cardiovascular, vivem respectivamente, 6,9 e 9,4 anos a mais sem a ocorrência de quaisquer doenças crônicas importantes (DCV, câncer, diabetes e demência), quando comparados àqueles com altas prevalências de fatores de risco (WANG et al., 2023).

A HAS é caracterizada por pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) persistentemente elevadas. Para o diagnóstico de HAS a PAS, a PAD ou ambas devem ser iguais ou superiores a 140 e 90 mm Hg, respectivamente (WILLIAMS et al., 2018). Pacientes com HAS, frequentemente, apresentam dislipidemia aterogênica caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos e LDL-colesterol (LDL-C), e baixos níveis de HDL-colesterol (HDL-C) (WILLIAMS et al., 2018). Tanto a HAS quanto a dislipidemia têm, além das condições genéticas, possível influência de uma alimentação não saudável. Dietas com maior ingestão de gordura saturada e *trans*, colesterol, sódio, alimentos ultra processados, açúcar e álcool estão associadas a maior risco de desenvolvimento de CDV (BAYS et al., 2021).

A busca por novas alternativas de tratamento e prevenção das DCV é constante, principalmente devido à complexidade das doenças, à evolução da ciência e tecnologia, às mudanças na população e hábitos de vida e o constante aprimoramento de custo-efetividade. Os modelos experimentais utilizados no início do processo de desenvolvimento de medicamentos relacionados ao sistema cardiovascular podem ser classificados em três grandes grupos: modelos *in silico*/computacionais, modelos *in vitro* e modelos animais. Sendo que, modelos animais, principalmente utilizando roedores, são amplamente difundidos nas pesquisas pré-clínicas, para a identificação de novos agentes farmacológicos (LEONG; NG; JAARIN, 2015; SAVOJI et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

Empregadas como substratos na indústria farmacêutica ou em seu uso popular e tradicional, as plantas representam-se como um recurso importante no tratamento de doenças e em sua prevenção (CALIXTO et al., 2001). Com cerca de 60 mil espécies vegetais catalogadas, e a maior diversidade vegetal do planeta, o Brasil ainda tem muito o que avançar em pesquisas científicas, visto que aproximadamente 1.100 espécies foram avaliadas quanto as suas propriedades medicinais. Além da vasta biodiversidade, o país ainda conta com a diversidade cultural e étnica dos seus habitantes, o que resulta em grande acúmulo de conhecimentos e técnicas tradicionais (BRASIL, 2016).

A família Verbenaceae é distribuída principalmente em climas temperados, subtropicais e desérticos, nativos do continente americano. Um arbusto aromático dessa família é *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke, planta cujo uso está intimamente ligado à cultura na América do Sul, muito utilizada para aromatizar “mate” ou “tereré”, bebidas típicas da região (MOLLER et al., 2020). Popularmente conhecida como “burrito”, a *A. polystachya* também é utilizada na medicina popular para tratar hipertensão, ansiedade, distúrbios gastrointestinais e respiratórios, além de seu emprego como sedativo (AGUADO et al., 2013; COELHO et al., 2019; HELLIÓN-IBARROLA et al., 2008).

Sabendo que o desenvolvimento e aprimoramento dos tratamentos para as doenças citadas começa com pesquisas pré-clínicas, e identificando uma lacuna na literatura quanto à investigação dos efeitos cardioprotetores da *A. polystachya*, o objetivo geral deste trabalho foi validar um modelo pré-clínico de doença cardiovascular induzido por múltiplos fatores de risco em ratos e avaliar o efeito cardioprotetor do extrato e do óleo essencial de *A. polystachya*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças cardiovasculares

As DCV foram a principal causa de mortalidade global e um dos principais contribuintes para a incapacidade entre os 204 países e territórios incluídos no estudo intitulado ‘Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study’ (2019). Houve um aumento de 12,1 milhões de mortes entre 1990 e 2019 atribuídas às DCV, e no ano de 2019, a prevalência de DCV atingiu 523 milhões (ROTH et al., 2020).

As DCV incluem, entre outras, o acidente vascular cerebral (AVC), alterações cardiovasculares congênitas, distúrbios do ritmo cardíaco, parada cardíaca súbita, aterosclerose subclínica, doença coronariana, síndrome coronária aguda e angina pectoris, cardiomiopatia e



insuficiência cardíaca (IC), doenças valvulares, tromboembolismo venoso, insuficiência venosa crônica, hipertensão pulmonar, doença arterial periférica, doenças aórticas e a HAS (VIRANI et al., 2021).

O total de mortes globais por DCV aumentou 21,1% entre 2007 e 2017, mas as taxas de mortalidade diminuíram de 259,9 mortes por 100.000 em 2007 para 233,1 por 100.000 em 2017. Do total de mortes por doenças cardiovasculares 84,9% foram causadas por doença cardíaca isquêmica ou AVC (ROTH et al., 2018). Em 2019, aproximadamente 18,6 milhões de mortes foram atribuídas às DCV, e a prevalência bruta de DCV foi de 523,2 milhões de casos, um aumento de 26,6% em comparação com 2010. As maiores taxas de mortalidade atribuíveis às DCV ocorreram na Europa Oriental e na Ásia Central, já a prevalência de DCV é mais alta no norte da África e Oriente Médio, Ásia Central e América do Norte (VIRANI et al., 2021; VOS et al., 2020).

No Brasil, no ano de 2021 foram registradas 1.008.244 internações no Sistema Único de Saúde motivadas por doenças do sistema circulatório, 71.807 delas na região Centro-Oeste, 12.132 em Mato Grosso do Sul e 1.731 especificamente na cidade de Dourados. O custo referente aos gastos hospitalares dessas internações no Brasil chegou a R\$ 2.902.921.053,95. Nesse mesmo período foram registrados 102.051 óbitos por doenças do sistema circulatório no SUS, 7.880 deles na região Centro-Oeste (DATASUS, 2021).

Vale ressaltar que a pandemia de coronavírus 2019 (COVID-19) impactou globalmente a saúde, a sociedade e a economia de forma inestimável. Há evidências de que as DCV e certos fatores de risco cardiovasculares, incluindo HAS, diabetes mellitus, doença renal, doença hepática, obesidade e tabagismo, estão associados a uma maior probabilidade de COVID-19 grave ou mortalidade pela doença. Ainda não existem evidências do impacto do COVID-19 na saúde cardiovascular a longo prazo, no entanto sabe-se que 25% dos casos de hospitalizações por COVID-19 podem culminar em complicações cardiovasculares (HARRISON et al., 2021).

## **2.2 Fatores de risco cardiovascular**

Dentre os aspectos passíveis de intervenção, um estilo de vida saudável é a forma mais efetiva de prevenir o declínio da saúde cardiovascular, principalmente quando se trata da prevenção de doença vascular aterosclerótica, IC e fibrilação atrial. Sabe-se, portanto, que existem fatores de risco que propiciam um aumento na ocorrência e/ou agravamento das DCV. Esses fatores de risco incluem nutrição não saudável, inatividade física, dislipidemia, hiperglicemia, obesidade, HAS, diferenças sexuais e de raça/etnia, trombose, tabagismo, disfunção renal e hipercolesterolemia genética/familiar (ARNETT et al., 2019).

Uma abordagem de cuidado de saúde que identifique previamente os fatores de risco cardiovascular garante um manejo seguro do paciente, antecipadamente às complicações cardiovasculares mais graves. É importante que a equipe multiprofissional de saúde esteja atenta a todos os aspectos que envolvem a saúde cardiovascular, uma vez que os pacientes frequentemente apresentam múltiplos fatores de risco concomitantemente (BAYS et al., 2021).

Há evidências de que uma melhor saúde cardiovascular está associada a menor incidência de IC e doença vascular subclínica, melhor desempenho físico funcional e cognitivo global e menor risco de demência subsequente, menor prevalência e incidência de sintomas depressivos, menos doença pulmonar obstrutiva crônica, e melhor prognóstico após infarto agudo do miocárdio (IAM), entre outros benefícios específicos à cada quadro clínico (VIRANI et al., 2021).

Para endossar a importância do manejo dos fatores de risco cardiovascular, o Projeto de Agrupamento de Risco Cardiovascular ao Longo da Vida (Cardiovascular Lifetime Risk Pooling Project), que compilou dados de 5 coortes (49.490 participantes), mostrou que adultos, sem fatores de risco (semelhante a ter níveis ideais de pressão arterial, de colesterol e glicose sanguíneos, assim como não fumar), têm sobrevida global substancialmente maior e com menor prevalência de DCV, do que aqueles que apresentam fatores de risco. Para exemplificar, um homem aos 45 anos sem fatores de risco vive em média 14 anos a mais, sem eventos cardiovasculares significativos, e 12 anos a mais que as pessoas que apresentam fatores de risco (WILKINS et al., 2012).

Para identificar previamente os pacientes com predisposição para o desenvolvimento de DCV e assim, garantir a prevenção efetiva com a correta definição das metas terapêuticas, são usados os escores de risco e algoritmos baseados em análises de regressão linear de estudos populacionais. O Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia do Brasil, atualmente utiliza o escore de risco global de Framingham para estratificar os pacientes em quatro níveis de risco: risco muito alto, risco alto, risco intermediário e risco baixo. A Tabela 1 demonstra as pontuações atribuídas para o cálculo do risco em mulheres e homens, e a Tabela 2 sumariza o percentual de risco de ocorrência de eventos coronarianos em 10 anos, de acordo com a pontuação (D'AGOSTINO et al., 2008; PRÉCOMA et al., 2019).

**Tabela 1. Atribuição de pontos de acordo com o risco global de Framingham**

| <b>Mulheres</b> |                    |              |                         |                          |                      |             |                 |
|-----------------|--------------------|--------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|-------------|-----------------|
| <b>Pontos</b>   | <b>Idade(anos)</b> | <b>HDL-C</b> | <b>Colesterol Total</b> | <b>PAS (não tratada)</b> | <b>PAS (tratada)</b> | <b>Fumo</b> | <b>Diabetes</b> |
| -3              |                    |              |                         | <120                     |                      |             |                 |
| -2              |                    | 60+          |                         |                          |                      |             |                 |
| -1              |                    | 50-59        |                         |                          | <120                 |             |                 |
| 0               | 30-34              | 45-49        | <160                    | 120-129                  |                      | Não         | Não             |
| 1               |                    | 35-44        | 160-199                 | 130-139                  |                      |             |                 |
| 2               | 35-39              | <35          |                         | 140-149                  | 120-139              |             |                 |
| 3               |                    |              | 200-239                 |                          | 130-139              | Sim         |                 |
| 4               | 40-44              |              | 240-279                 | 150-159                  |                      |             | Sim             |
| 5               | 45-49              |              | 280+                    | 160+                     | 140-149              |             |                 |
| 6               |                    |              |                         |                          | 150-159              |             |                 |
| 7               | 50-54              |              |                         |                          | 160+                 |             |                 |
| 8               | 55-59              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 9               | 60-64              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 10              | 65-69              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 11              | 70-74              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 12              | 75+                |              |                         |                          |                      |             |                 |
| <b>Homens</b>   |                    |              |                         |                          |                      |             |                 |
| -2              |                    | 60+          |                         | <120                     |                      |             |                 |
| -1              |                    | 50-59        |                         |                          |                      |             |                 |
| 0               | 30-34              | 45-49        | <160                    | 120-129                  | <120                 | Não         | Não             |
| 1               |                    | 35-44        | 160-199                 | 130-139                  |                      |             |                 |
| 2               | 35-39              | <35          | 200-239                 | 140-159                  | 120-139              |             |                 |
| 3               |                    |              | 240-279                 | 160+                     | 130-139              |             | Sim             |
| 4               |                    |              | 280+                    |                          | 140-159              | Sim         |                 |
| 5               | 40-44              |              |                         |                          | 160+                 |             |                 |
| 6               | 45-49              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 7               |                    |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 8               | 50-54              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 9               |                    |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 10              | 55-59              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 11              | 60-64              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 12              | 65-69              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 13              |                    |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 14              | 70-74              |              |                         |                          |                      |             |                 |
| 15              | 75+                |              |                         |                          |                      |             |                 |

**Fonte:** Adaptada de Précoma et al. (2019). PAS: pressão arterial sistólica

**Tabela 2. Risco global em 10 anos**

| Mulheres |           |        |           | Homens |           |        |           |
|----------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| Pontos   | Risco (%) | Pontos | Risco (%) | Pontos | Risco (%) | Pontos | Risco (%) |
| ≤ -2     | <1        | 11     | 7,3       | ≤ -3   | < 1       | 10     | 9,4       |
| -1       | 1,0       | 12     | 8,6       | -2     | 1,1       | 11     | 11,2      |
| 0        | 1,2       | 13     | 10,0      | -1     | 1,4       | 12     | 13,2      |
| 1        | 1,5       | 14     | 11,7      | 0      | 1,6       | 13     | 15,6      |
| 2        | 1,7       | 15     | 13,7      | 1      | 1,9       | 14     | 18,4      |
| 3        | 2,0       | 16     | 15,9      | 2      | 2,3       | 15     | 21,6      |
| 4        | 2,4       | 17     | 18,5      | 3      | 2,8       | 16     | 25,3      |
| 5        | 2,8       | 18     | 21,6      | 4      | 3,3       | 17     | 29,4      |
| 6        | 3,3       | 19     | 24,8      | 5      | 3,9       | 18+    | >30       |
| 7        | 3,9       | 20     | 28,5      | 6      | 4,7       |        |           |
| 8        | 4,5       | 21     | >30       | 7      | 5,6       |        |           |
| 9        | 5,3       |        |           | 8      | 6,7       |        |           |
| 10       | 6,3       |        |           | 9      | 7,9       |        |           |

**Fonte:** Adaptada de Précoma et al. (2019)

### 2.2.1 Nutrição não saudável

O hábito alimentar saudável é um importante aliado da saúde cardiovascular, uma vez que padrões alimentares desbalanceados estão fortemente associados ao desenvolvimento de DCV, bem como de outros fatores de risco cardiovascular, como a dislipidemia, HAS e o diabetes mellitus tipo II (BECHTHOLD et al., 2019).

São considerados hábitos alimentares promotores da saúde cardiovascular a priorização de ingestão de legumes, frutas, oleaginosas, grãos integrais, sementes, peixes, alimentos ricos em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados e fibra solúvel, em detrimento da redução de ingestão de gordura saturada, excesso de sódio, colesterol, carboidratos simples, carnes ultraprocessadas, bebidas açucaradas, bebidas alcoólicas e gorduras *trans* (BAYS et al., 2021).

Para demonstrar a influência da alimentação sobre o risco cardiovascular é importante citar dados de metanálise e revisões sistemáticas que compilaram estudos prospectivos, ensaios clínicos e de caso controle ao redor do mundo. Bechthold et al. (2019) analisaram 126 estudos prospectivos e evidenciaram que o risco de doença coronariana, IAM e IC estava inversamente associado ao consumo de vegetais e frutas, grãos integrais, nozes e peixes, e que, por outro lado, o risco para essas condições estava positivamente associado ao consumo de ovos, carne vermelha, carne processada e bebidas açucaradas.

A metanálise de Wang et al. (2014) compilou 16 estudos prospectivos de coorte e concluiu que cada porção adicional de frutas e vegetais combinados estava associada a um risco 4% menor de mortalidade cardiovascular. Outro estudo prospectivo incluindo 512.891 adultos na China identificou que os indivíduos que comiam frutas frescas diariamente (18%) tinham 34% menor risco de eventos coronarianos graves e uma redução de 40% no risco de morte por DCV (DU et al., 2016).

Em uma metanálise de estudos prospectivos de coorte e caso-controle, o consumo de carne vermelha não processada não foi significativamente associado à incidência de doença coronariana. Por outro lado, cada porção de 50 g por dia de carnes processadas foi associada a uma maior incidência de doenças coronarianas (MICHA; WALLACE; MOZAFFARIAN, 2010).

Em um estudo com profissionais da saúde, o consumo de uma porção de nozes por pelo menos cinco vezes na semana foi associado a menor risco de DCV (GUASCH-FERRÉ et al., 2017). Outro estudo transversal com 12.285 adultos, identificou que o consumo > 30 g de álcool por dia estava associado a um maior risco de síndrome metabólica, HAS, hiperglicemia e obesidade abdominal (SULIGA et al., 2019).

A metanálise de Jayedi et al. (2019) identificou que um aumento de 1 g/dia na ingestão de sódio foi associado a um aumento de 6% no risco de AVC; e a adição de 1 unidade na razão sódio-potássio na dieta foi associada a um aumento de 22% no risco de AVC. Outro estudo concluiu que, uma redução para 2.300 mg/dia no sódio da dieta foi associada a uma queda de 7,7 mm Hg na PAS e 3,0 mm Hg na PAD entre pessoas com pressão arterial > 131/78 mm Hg (MOZAFFARIAN et al., 2014).

Quanto ao consumo de fibras e grãos integrais, estudos demonstram que uma maior ingestão de fibras está associada à redução do peso corporal, colesterol total, pressão arterial e hemoglobina glicada. Além disso, uma ingestão aumentada de grãos integrais promove redução no risco de desenvolvimento e de morte por doenças coronárias e AVC (REYNOLDS et al., 2019).

O consumo de ácidos graxos *trans* saturados aumenta o risco de doenças coronarianas por promover alterações no perfil lipídico. Uma vez que as gorduras *trans*, ao promoverem aumento de LDL-C e reduções de HDL-C, promovem também a inflamação e a disfunção endotelial, e possíveis efeitos na coagulação, resistência à insulina e deslocamento de ácidos graxos essenciais das membranas (UAUY et al., 2009).

O mecanismo de proteção cardiovascular associado ao consumo de frutas e vegetais está, em parte, ligado aos compostos antioxidantes e polifenóis, como a vitamina C,

carotenoides e flavonoides. Estes, demonstraram prevenir a oxidação do colesterol e outros lipídios nas artérias. Além disso, estimulam a síntese de prostaciclina endotelial que inibe a agregação plaquetária e reduz o tônus vascular, o que possibilita a redução da pressão arterial. Frutas e vegetais também são boas fontes de magnésio e potássio, que foram inversamente associadas à mortalidade em estudos anteriores. Além disso, toda a composição fitoquímica desses alimentos influencia não apenas os processos inflamatórios, mas também os processos redox celulares e a função endotelial (WANG et al., 2014).

Os nutrientes essenciais associados aos fitonutrientes e fibras presentes nos grãos integrais podem contribuir sinergicamente para seus efeitos cardiovasculares positivos. Tais efeitos, podem estar associados à redução das concentrações de LDL-C por meio da fibra solúvel; modulação das respostas glicêmica e insulinêmica, melhorando a função vascular e a pressão arterial e o controle de peso; às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, possivelmente devido à presença de polifenóis e outros fitonutrientes; entre outros mecanismos (BECHTHOLD et al., 2019).

A associação entre o consumo de peixes e baixos níveis de risco cardiovascular podem estar relacionada aos efeitos de ácidos graxos poli-insaturados n-3 de cadeia longa, que são abundantes em peixes gordurosos e têm sido associados a efeitos antiateroscleróticos e antitrombóticos. Já o aumento de risco cardiovascular associado ao consumo de carne vermelha e processada pode estar associado aos compostos pró-inflamatórios ou pró-oxidativos, como nitrosaminas, ferro ou ácidos graxos saturados (BECHTHOLD et al., 2019).

O risco cardiovascular aumentado relacionado ao consumo de bebidas açucaradas pode estar relacionado aos distúrbios na regulação da fome e saciedade, uma vez que há evidências substanciais de que o consumo dessas bebidas contribui para o ganho de peso e obesidade em adultos, sendo a obesidade um importante fator de risco para DCV (BECHTHOLD et al., 2019). As castanhas, por sua vez, influenciam positivamente o risco cardiovascular devido ao seu conteúdo de ácidos graxos insaturados, proteínas, fibras, vitamina E, potássio, magnésio e compostos fitoquímicos, que possuem mecanismos sinérgicos de ação (SCHWINGSHACKL et al., 2017).

A relação entre o consumo de sódio e o aumento da pressão arterial já é bem estabelecida na literatura, porém, além disso, há dados que sugerem efeitos da ingestão de sódio e potássio sobre AVC ou DCV que podem ser independentes dos efeitos sobre a pressão arterial. A excreção urinária de sódio mostrou-se positivamente relacionada à excreção urinária de albumina, o que sugere que o efeito do sódio nas DCV pode ser parcialmente mediado por dano endotelial. Outros mecanismos propostos para um efeito cardiovascular do sódio independente

da pressão arterial incluem o aumento do fluxo sanguíneo e reatividade vascular e um efeito direto sobre a massa ventricular esquerda (COOK et al., 2009).

### 2.2.2 Inatividade física

Qualquer movimento corporal através dos músculos esqueléticos que requer gasto energético é considerado como atividade física, no entanto, a classificação da intensidade da atividade física é definida em termos de unidades metabólicas equivalentes (Metabolic Equivalent Task (METs)). Um MET é definido como o oxigênio consumido em repouso e é igual a 3,5 mL de O<sub>2</sub> por kg de peso corporal x minutos. Atividade leve equivale a 1,6 a 2,9 METs, atividade de intensidade moderada a 3,0 a 5,9 METs, e a atividade vigorosa a  $\geq 6$  METs. A inatividade física pode ser definida como um estado de permanência em baixos níveis de gasto energético (1–1,5 METs) (BAYS et al., 2021).

A atividade física é um aspecto importante da saúde geral. Indivíduos fisicamente ativos não apenas possuem menores índices de mortalidade prematura, menores prevalências de doença coronariana, IC, AVC e doenças relacionadas ao envelhecimento, como também apresentam menos fatores de risco para DCV, incluindo a HAS, diabetes e obesidade (VIRANI et al., 2021). No entanto, em 2016, a prevalência de inatividade física global era de 27,5% (IC 95%, 25,0% – 32,2%), sendo que a prevalência não se altera significativamente desde 2001 (28,5%) (GUTHOLD et al., 2018).

A metanálise de Wewege et al. (2018) incluiu 11 estudos que investigaram o papel do exercício físico entre indivíduos com síndrome metabólica. O exercício aeróbico melhorou significativamente a PAD (-1,6 mm Hg;  $p = 0,01$ ), a circunferência da cintura (-3,4 cm;  $p < 0,01$ ), glicemia de jejum (-0,15 mmol/L;  $p = 0,03$ ) e o HDL-C (0,05 mmol/L;  $p = 0,02$ ). Uma coorte que incluiu 23.732 indivíduos, evidenciou que ir de bicicleta para o trabalho foi associado a menores chances de desenvolver HAS, hipertrigliceridemia, obesidade e intolerância à glicose em comparação com o uso de meios de transporte passivos no acompanhamento de 10 anos (GRØNTVED et al., 2016).

Outra metanálise que incluiu 29 estudos com 330.222 participantes identificou que, cada nível 10-METS h/semana mais alto de atividade física, foi associado a um risco 6% menor de HAS (LIU et al., 2017). Outro estudo envolvendo idosos, durante dois anos, identificou que níveis mais altos de atividade física e de passo diários foram associados a menor risco de eventos cardiovasculares severos (COCHRANE et al., 2017).

Existe uma relação estabelecida por um estudo de revisão entre a contagem de passos diários e a redução da ocorrência de eventos cardiovasculares. Sendo que, o aumento de 2.000

passos/dia produz uma redução de 8% da taxa anual de ocorrência de morte cardiovascular, IAM ou AVC não fatal (KRAUS et al., 2019). A atividade física reduz o risco de DCV predominantemente por meio de mudanças no perfil dos fatores de risco cardiovascular, como a redução da pressão arterial, LDL-C e colesterol (PANDEY et al., 2015).

A elucidação do mecanismo de atuação da atividade física na melhora dos níveis pressóricos, por exemplo, é complexa, devido à origem multifatorial da HAS. Os principais mecanismos envolvidos incluem a redução da resistência periférica total, melhora da função endotelial por meio da redução do débito cardíaco e a redução da atividade nervosa simpática e dos níveis plasmáticos de norepinefrina. Outra via de ação pode estar relacionada ao aumento da sensibilidade à insulina provocada pela atividade física, uma vez que a hiperinsulinemia e a resistência à insulina podem contribuir para a HAS através da retenção de sódio, aumento da atividade do sistema nervoso simpático e hipertrofia do músculo liso vascular. A atividade física também diminui a viscosidade do plasma, o que pode contribuir para a manutenção da homeostase vascular (LIU et al., 2017).

### **2.2.3 Dislipidemia**

Os lipídeos são importantes componentes celulares, teciduais e de órgãos do corpo humano e podem apresentar-se em diversas classes: gorduras, esteroides, fosfolipídios, triglicerídeos e colesterol. Por serem apolares, seu transporte no sangue é feito por meio das lipoproteínas e essas, são aterogênicas, com exceção às HDL. As lipoproteínas aterogênicas podem se aderir aos espaços subendoteliais, onde podem sofrer oxidação e eliminação por macrófagos arteriais, resultando em células espumosas, estrias gordurosas e, em seguida, formação de placa aterosclerótica. O aumento progressivo da placa aterosclerótica pode produzir estreitamento crônico hemodinamicamente significativo da artéria, resultando em angina ou claudicação. A ruptura aguda da placa pode induzir IAM e/ou AVC (BAYS et al., 2021).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que se dá em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. O processo de formação da placa aterosclerótica (aterogênese) inicia-se com a agressão ao endotélio vascular, sendo estimulado por fatores de risco como dislipidemia, HAS e/ou tabagismo. A disfunção endotelial estimula o aumento de permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, promovendo a exposição de



diversos neoepítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma (FALUDI et al., 2017).

Outra manifestação da disfunção endotelial, estimulado pela presença de LDL oxidada, é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos que, induzidos por proteínas quimiotáticas, migram para o espaço subendotelial, no qual se diferenciam em macrófagos, que, por sua vez, captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Uma vez ativados, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica devido à secreção de citocinas, que aumentam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (FALUDI et al., 2017).

Os mediadores de inflamação estimulam a migração e a proliferação das células musculares lisas da camada média arterial para a íntima, onde passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular, que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica. A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico necrótico. As placas estáveis são compostas predominantemente por colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, poucas células inflamatórias e núcleo lipídico necrótico de proporções menores. Já as instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico necrótico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, originando um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (FALUDI et al., 2017).

Os níveis de apolipoproteína B (apoB) e o número de partículas de LDL são preditores de risco aterosclerótico superiores à medição do colesterol transportado por lipoproteínas aterogênicas (LDL-C), principalmente quando os números de partículas de lipoproteínas aterogênicas são maiores do que os níveis relativos ao colesterol de lipoproteínas aterogênicas (casos de diabetes mellitus ou dislipidemia adiposopática (JIALAL; SINGH, 2019)). No entanto o LDL-C continua sendo o principal alvo do tratamento na maioria das diretrizes de gerenciamento de dislipidemia (BAYS et al., 2021).

Como existe uma molécula de apoB em toda molécula de lipoproteína, e sabendo que todo colesterol existente em lipoproteínas aterogênicas é aterosclerótico, define-se que o colesterol não-HDL e a apoB em conjunto, refletem mais fidedignamente os riscos de

aterosclerose. Contudo, as diretrizes para o tratamento lipídico são geralmente enfocadas em alvos, definindo metas e limiares de níveis de lipídios (BAYS et al., 2021). A Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose define os valores de referência (Tabela 3) de acordo com a classificação do risco cardiovascular de cada paciente (FALUDI et al., 2017).

**Tabela 3. Valores referenciais e de alvo terapêutico, conforme avaliação de risco cardiovascular estimado do perfil lipídico para adultos com mais de 20 anos.**

| Lipídeos           | Com jejum (mg/dL) | Sem jejum (mg/dL) | Categoria referencial |
|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Colesterol total   | < 190             | < 190             | Desejável             |
| HDL-C              | > 40              | > 40              | Desejável             |
| Triglicerídeos     | < 150             | < 175             | Desejável             |
| Categoria de risco |                   |                   |                       |
| LDL-C              | < 130             | < 130             | Baixo                 |
|                    | < 100             | < 100             | Intermediário         |
|                    | < 70              | < 70              | Alto                  |
|                    | < 50              | < 50              | Muito alto            |
| Não HDL-C          | < 160             | < 160             | Baixo                 |
|                    | < 130             | < 130             | Intermediário         |
|                    | < 100             | < 100             | Alto                  |
|                    | < 80              | < 80              | Muito alto            |

**Fonte:** adaptado de FALUDI et al., 2017

De acordo com o GDB 2019, estudo dos fatores de risco para mortalidade, o LDL-C aumentado contribuiu para cerca de 4,4 milhões de mortes em todo o mundo. Essas mortes ocorreram principalmente na Europa Oriental, Ásia Central, África do Norte e Oriente Médio (VOS et al., 2020). Em relação ao colesterol total, entre 1980 e 2008, os níveis médios diminuíram nas regiões de alta renda do mundo (Austrália, América do Norte e Europa Ocidental), mas aumentaram no Leste e Sudeste Asiático e Pacífico. Porém, em 2008 os níveis médios mais altos de colesterol total foram observados em regiões de alta renda da Austrália, América do Norte e Europa Ocidental, e menores na África Subsaariana (FARZADFAR et al., 2011).

## 2.2.4 Hiperglicemia

A hiperglicemia pode contribuir significativamente com o risco cardiovascular, principalmente nos casos de diabetes mellitus. O diabetes tipo 1 resulta de uma deficiência

absoluta na secreção de insulina, enquanto o tipo 2 é caracterizada por uma resistência à insulina que, uma vez combinada à uma resposta insulinêmica ineficiente, resulta em hiperglicemia. A resistência à insulina geralmente está associada à adiposidade, no entanto induz à hiperglicemia, que por sua vez, contribui com a resistência à insulina por meio da glicotoxicidade. Em ambos os casos (tipos 1 e 2), o diabetes pode promover as doenças micro e macrovasculares, além de atuar como fator de risco para as DCV, principalmente nas doenças coronarianas e no AVC (BAYS et al., 2021).

A hiperglicemia também é um fator agravante para o desenvolvimento de aterosclerose, com mecanismos diretos e indiretos de atuação. De forma direta, a elevada concentração de glicose no sangue pode promover a disfunção endotelial, o estresse oxidativo, aumento da oxidação de LDL, inflamação generalizada e alterações na óxido nítrico sintase endotelial. De forma indireta, a hiperglicemia influencia a hiperatividade plaquetária. Já a resistência à insulina pode aumentar os ácidos graxos não esterificados circulantes e contribuir com a dislipidemia (TRIPATHY et al., 2019).

O estudo de Bancks et al. (2019) avaliou adultos de meia idade e identificou que o risco cardiovascular está relacionado aos valores de glicemia, ainda que em níveis abaixo das faixas de valores que diagnosticam o diabetes. Entre as mulheres, o risco absoluto de DCV foi de 15,3% para glicemia de jejum  $< 5,0$  mmol/L e 18,6% para glicemia de jejum entre 6,3 e 6,9 mmol/L. Entre os homens, esse risco foi de 23,5% para glicemia de jejum  $< 5,0$  mmol/L e 31,0% para glicemia de jejum entre 6,3 e 6,9 mmol/L. Dados prévios a esse estudo também sugeriam que o risco de DCV em pacientes com diabetes variam de 49% a 67% para mulheres e 62% a 78% para homens (FOX et al., 2008).

Dados epidemiológicos sugerem que a prevalência de diabetes aumentou 199,3% para homens e 179,8% para mulheres entre 1990 e 2019. No mundo, 237,9 milhões de homens e 222,0 milhões de mulheres são portadores de diabetes (VOS et al., 2020). Estima-se que entre 20% e 49% dos custos direcionados aos cuidados de pacientes com diabetes sejam relacionados às DCV (EINARSON et al., 2018).

### **2.2.5 Obesidade**

O índice de massa corporal (IMC) é calculado a partir do peso e da altura dos indivíduos, para classificar seu estado nutricional. Um IMC entre 25 e 30 kg/m<sup>2</sup> classifica o indivíduo em estado de sobrepeso, já a obesidade, pode ser classificada em três tipos: obesidade tipo I (IMC entre 30 e 34,9 kg/m<sup>2</sup>), tipo II (IMC entre 35 e 39,9 kg/m<sup>2</sup>) e tipo III (IMC acima de 40 kg/m<sup>2</sup>). O aumento do IMC, acima dos níveis de eutrofia, está associado a um aumento no cálcio da

artéria coronária, aumento na espessura da camada íntima da carótida, espessura do ventrículo esquerdo e aumento do risco de DCV ao longo da vida (KHAN et al., 2018; BAYS et al., 2021).

Vale ressaltar que, em casos de alto percentual de musculatura, os indivíduos podem apresentar um IMC superestimado, já que ele não leva em consideração os compartimentos corporais; nesses casos, a classificação deve ser feita com cautela. Avaliar o percentual de gordura corporal é sempre mais específico do que quantificar o IMC, no entanto os pontos de corte ainda são subjetivos e há ampla variação quanto à acurácia dos métodos de avaliação de gordura corporal. Muitos dados suportam a avaliação dos valores de circunferência da cintura ( $\geq 88$  para mulheres e  $\geq 102$  para homens) ou relação cintura-quadril ( $> 0,9$  em homens e  $> 0,83$  em mulheres), para aferir correlações com o risco de DCV, visto que um aumento na circunferência da cintura reflete a disfunção adiposopática, que direta e indiretamente aumenta o risco de DCV (CAO et al., 2018).

A obesidade promove um comprometimento da saúde cardiovascular devido à aspectos biomecânicos, bioquímicos e endócrinos. Os efeitos adversos biomecânicos estão relacionados ao comprometimento da função cardíaca por meio de contenção mecânica pericárdica, expansão ventricular esquerda prejudicada, enchimento ventricular esquerdo prejudicado e IC diastólica. Já as alterações bioquímicas e endócrinas estão relacionadas à disfunção dos adipócitos, que em casos de obesidade, apresentam respostas imunes e endócrinas desreguladas, podendo promover diretamente as DCV ou agravar doenças metabólicas (BAYS, 2011).

A hipertrofia e hiperplasia patológica do tecido adiposo pode originar um quadro conhecido como adiposopatia, que pode ter etiologia relacionada ao balanço energético positivo, inatividade física, predisposição genética e causas ambientais. Anatomicamente, na adiposopatia, o tecido adiposo, além de aumentado, pode estar mais amplamente distribuído pelo corpo, promovendo adiposidade visceral, pericárdica, perivascular e de outros órgãos. Essas alterações patológicas estimulam a desregulação fisiológica como a adipogênese prejudicada, disfunção patológica das organelas dos adipócitos, aumento dos ácidos graxos livres circulantes, alteração nas respostas endócrinas do tecido adiposo (aumento da excreção de leptina, aumento do fator de necrose tumoral alfa, diminuição da adiponectina e aumento dos mineralocorticoides) e respostas imunes patogênicas (BAYS, 2011). Em suma, todas essas alterações implicam em um quadro clínico de hiperglicemia, HAS, dislipidemia, síndrome metabólica e esteatose hepática, que estão associadas ao aumento do risco de DCV (BAYS et al., 2021).

Entre 1980 e 2013, a prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou 27,5% em indivíduos adultos, atingindo o total estimado de 2,1 bilhões em 2013. A maior prevalência de

obesidade masculina está nos Estados Unidos, América Latina, Austrália e Europa; para as mulheres, a maior prevalência de obesidade está no sul e norte da África, Oriente Médio, América Central e do Sul e Estados Unidos (NG et al., 2014).

### **2.2.6 Hipertensão arterial sistêmica**

Níveis aumentados da pressão arterial sistêmica, contribuem para o aumento do risco cardiovascular. É estabelecido que a PAS < 120 mm Hg e PAD < 80 mm Hg (para adultos  $\geq$  20 anos de idade) é um fator importante para a manutenção da saúde cardiovascular (VIRANI et al., 2021). A HAS constantemente coexiste com outros fatores de risco cardiovascular, como dislipidemia e intolerância à glicose (WILLIAMS et al., 2018).

A HAS é caracterizada por PAS e PAD persistentemente elevada nas artérias sistêmicas. Para o diagnóstico de HAS a PAS, a PAD ou ambas devem ser iguais ou superiores a 140 e 90 mm Hg, respectivamente (WILLIAMS et al., 2018). Para garantir uma aferição precisa, o paciente deve evitar cafeína, exercício físico, estresse e/ou fumo por 30 minutos antes da medição da pressão arterial; deve esvaziar a bexiga; deve estar sentado com os pés apoiados no chão por cinco minutos; o aparelho utilizado deve estar calibrado e possuir tamanho adequado ao paciente e é imprescindível que o profissional seja treinado para executar tal aferição (BAYS et al., 2021).

Entre os anos de 1990 e 2019, a prevalência de PAS elevada aumentou de 2,18 bilhões para 4,06 bilhões, demonstrando-se como um grande desafio de saúde pública, afetando aproximadamente 9 em cada 10 adultos em todo o mundo. O número de mortes atribuídas à PAS elevada, também aumentou de 6,7 milhões para 10,8 milhões nesse mesmo período (ROTH et al., 2020). A HAS é uma das principais causas modificáveis de morte prematura e uma das metas globais da Organização Mundial da Saúde para a prevenção de doenças não transmissíveis (NGUYEN; CHOW, 2021).

A redução dos níveis pressóricos propicia a redução do risco de DCV, da progressão da doença renal e da mortalidade geral (WHELTON et al., 2020; BAYS et al., 2021). A prática de atividade física, a melhora de hábitos alimentares (redução do consumo de sódio e álcool e adequado consumo de potássio), a manutenção do peso corporal e a interrupção do tabagismo são fatores importantes para promover a redução da pressão arterial (BAYS et al., 2021).

Outra estratégia eficiente e acessível para o tratamento da HAS é a intervenção farmacológica. Apesar disso, as taxas de tratamento e controle de paciente com HAS por meio de medicamentos ainda permanecem baixas, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (MILLS et al., 2016). A terapia anti-hipertensiva inicial comumente inclui o

uso isolado, ou em associação, de um inibidor do sistema renina-angiotensina (inibidor da enzima conversora de angiotensina ou bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II), um bloqueador dos canais de cálcio, um betabloqueador e/ou um diurético tiazídico (BAYS et al., 2021).

### **2.3 Modelos experimentais para o estudo das doenças cardiovasculares**

Os tratamentos das DCV experienciaram constantes alterações no decorrer das décadas, visto que o avanço nas pesquisas elucida novos fatos acerca da fisiopatologia das doenças, o que propicia o aprimoramento de seus tratamentos. Existem duas necessidades fundamentais para o aprimoramento e desenvolvimento de modelos experimentais precisos e preditivos: primeiro, elucidar e descobrir novos tratamentos para as DCV que lideram as taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo; e segundo, identificar moléculas e preparações com baixa e nenhuma eficácia, além de mapear possíveis efeitos adversos e tóxicos dos medicamentos desenvolvidos (LEONG; NG; JAARIN, 2015; SAVOJI et al., 2019).

Os modelos experimentais utilizados no início do processo de desenvolvimento de medicamentos relacionados ao sistema cardiovascular podem ser classificados em três grandes grupos: modelos *in silico*/computacionais, modelos *in vitro* e modelos animais. Os modelos *in silico* possibilitam o aprimoramento da triagem de cardiotoxicidade induzida por drogas por meio da modelagem cardíaca estatística/empírica. Basicamente, demonstram as possíveis interações de droga-alvo (p.ex. canais iônicos e proteínas) e seus efeitos na função vascular e cardíaca, empregando as leis físico-químicas conhecidas para delinear digitalmente a ligação de moléculas a diferentes sítios celulares (LEONG; NG; JAARIN, 2015; SAVOJI et al., 2019; ZHANG et al., 2021)

Entre os métodos de estudo *in vitro* destacam-se as culturas celulares. Nesse caso, é imprescindível que haja disponibilidade de células de alta qualidade que se assemelhem ao tecido vascular ou cardíaco. Essas células podem ser células primárias, linhagens celulares ou células-tronco pluripotentes indiferenciadas (EMMERT; HITCHCOCK; HOERSTRUP, 2014). As células primárias são colhidas diretamente do tecido cardiovascular, possuindo vida útil limitada e características fenotípicas semelhantes ao *in vivo*. Podem ser provenientes de galinhas embrionárias, ratos/camundongos neonatos e outras espécies. O uso de células primárias extraídas de biópsias humanas é incomum, visto que sua capacidade extremamente limitada de proliferar dificulta a disponibilidade celular para pesquisas (SAVOJI et al., 2019). Por esses motivos, a maioria das pesquisas *in vitro* utiliza linhagens celulares, principalmente devido a sua capacidade de expansão ilimitada. As linhagens mais comuns são de fibroblastos,

células musculares lisas e células endoteliais, que a partir da regeneração tecidual, podem se assemelhar a um tecido cardíaco. No entanto, também possuem limitações, sobretudo alterações do comportamento celular conforme se alteram os meios de cultura. Além disso, a origem da linhagem e a manipulação genética para sua imortalização pode afetar as suas propriedades funcionais (SAVOJI et al., 2019).

Como uma alternativa para contornar as limitações das células primárias e linhagens celulares, as células-tronco têm sido aprimoradas para as pesquisas cardiovasculares *in vitro*. Células-tronco são células indiferenciadas com a capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos de células especializadas. Para as pesquisas em DCV, as células são provenientes de células-tronco embrionárias humanas e células-tronco pluripotentes induzidas. A diferenciação específica, no entanto, é um desafio, já que pode ser influenciada por diferentes aspectos, incluindo fatores de crescimento, proteínas, aminoácidos, íons ativos e co-cultura com células ou tipos de tecidos relevantes (LEONG; NG; JAARIN, 2015; SAVOJI et al., 2019).

Outra possibilidade para os modelos *in vitro* são os modelos cardíacos 2D e 3D. Os modelos 2D são empregados na investigação da cardiotoxicidade em nível celular por meio da fabricação de tecidos com cardiomiócitos alinhados; enquanto os modelos 3D fornecem um microambiente ainda mais realista e semelhante ao tecido nativo. Os modelos 3D podem ser obtidos a partir de células encapsuladas dentro de hidrogéis ou pela semeadura de células em estruturas pré-fabricadas com proteoglicanos da matriz extracelular descelularizados do tecido cardíaco nativo e sobrepondo folhas de células 2D (CETNAR et al., 2021; VERNEREY et al., 2021)

Um dos aspectos que propicia o uso de animais em pesquisas biomédicas é a viabilidade. A facilidade de gerenciamento de fatores ambientais e de consumo alimentar, o ciclo de vida mais curto e a possibilidade de isolamento de órgãos e tecidos caracterizam essa viabilidade. Outro aspecto é a semelhança com os seres humanos, exemplos disso são os chimpanzés e camundongos que compartilham cerca de 99% e 98% do DNA com os humanos, respectivamente. Além disso, o uso de animais é essencial para garantir a eficácia e a segurança de medicamentos nas fases pré-clínicas, ou seja, testes de toxicidade, farmacodinâmica e perfil farmacocinético de drogas podem ser investigados em animais antes que os compostos ou formulações sejam usados em pacientes humanos (CHIMPANZEE SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2005; LEONG; NG; JAARIN, 2015).

Os modelos que se utilizam de animais como cães, porcos, macacos e outras espécies são considerados mais próximos da anatomia humana, e possuem melhor disponibilidade de tecidos. O perfil lipídico desses animais é semelhante ao humano, exceto para subclasses de

HDL humano, sendo assim, são moderadamente mais sensíveis à aterogênese. Por outro lado, esses animais apresentam manutenção e manuseio mais dificultosos, escassez de modelos genéticos e questões éticas mais pungentes (SAVOJI et al., 2019).

Os animais de pequeno porte (ratos, camundongos, coelhos e gatos), são amplamente utilizados em pesquisas relacionadas ao sistema cardiovascular. No entanto, devido às diferenças fisiológicas entre essas espécies e humanos, a relevância dos dados deve ser considerada ao analisar os resultados obtidos. As vantagens no uso desses animais incluem o fácil manuseio e manutenção, curto tempo de gestação, baixo custo e a capacidade de manipulação genética (SAVOJI et al., 2019).

### **2.3.1 Modelos experimentais para o estudo de fatores de risco cardiovascular em roedores**

Os modelos experimentais para o desenvolvimento de HAS incluem métodos cirúrgicos, ambientais, farmacológicos e a manipulação genética dos animais. Um exemplo de HAS de origem genética é o rato espontaneamente hipertenso (Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)), uma linhagem isogênica que apresenta aumentos progressivos da pressão arterial a partir dos 3 meses de idade, atingindo um platô por volta de 180 dias após o nascimento. Atualmente, é um dos principais modelos de HAS utilizados em pesquisas de triagem de compostos anti-hipertensivos. A linhagem SHR originou-se em Kyoto (Japão) através do cruzamento de ratos Wistar Hannover que exibiram elevações espontâneas da pressão arterial. A manutenção da linhagem foi possível através de endogamia ao longo de várias gerações. Outras linhagens de ratos propensas a HAS de origem genética inclui o *Dahl Salt-Sensitive rats*, o *Fawn-hooded rats* (oriundos da mutação espontânea em ratos Long-Evans), o *Milan hypertensive rat*, o *Lyon genetically hypertensive rats*, o *Sabra hypertension-prone rat* e o *borderline hypertensive rat* (LERMAN et al., 2019).

Outros modelos de HAS em roedores envolvem alterações ambientais, manipulação farmacológica (p.ex. mineralocorticoides, vasoconstritores e inibidores da síntese do óxido nítrico), e/ou cirúrgica (p.ex. hipertensão renovascular). Um modelo que envolve hipertensão renovascular é o dois rins-um clipe (2 kidneys-1clip (2K1C)). O modelo 2K1C foi descrito pela primeira vez por Goldblatt *et al.* (1934) e tornou-se um modelo animal bem estabelecido de HAS. Este modelo envolve a constrição parcial das artérias renais, o que leva ao desenvolvimento de hipertensão renovascular. Uma variação desse modelo envolve a remoção cirúrgica de um dos rins, ou seja, a nefrectomia unilateral seguida da clipagem da artéria renal do órgão remanescente (um rim- um clip) (GOLDBLATT et al., 1934; LERMAN et al., 2019).



Para os modelos de aterosclerose/dislipidemias são utilizados principalmente animais não roedores alimentados com dieta hiperlipídica/hipercolesterolêmica (p.ex. coelhos e cães) devido a resistência dos roedores ao desenvolvimento da doença. Os roedores apresentam um metabolismo lipídico baseado em HDL, e não em LDL, como os seres humanos, sendo assim apresentam resistência para o desenvolvimento das placas ateroscleróticas (LEONG; NG; JAARIN, 2015). Além disso, outros fatores estão atrelados à essa resistência: ausência do desenvolvimento de capa fibrótica característica; o número reduzido de lamelas na camada média de artérias normais de roedores em relação ao humanos; ausência de *vasa vosorum* medial, observada nas grandes artérias de humanos; ausência da manifestação de placas ateroscleróticas instáveis; ausência de desenvolvimento de placas nas artérias coronárias, mas sim na raiz da aorta, provavelmente por causa da alta frequência cardíaca de roedores (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019).

Para superar essa resistência, inúmeros modelos murinos geneticamente modificados foram produzidos, incluindo os camundongos deficientes de apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>), camundongos deficientes de receptor de LDL (LDLR<sup>-/-</sup>), *Zucker Diabetic Fatty* rat model (possui uma mutação autossômica espontânea no gene da leptina e desenvolve um fenótipo de hiperfagia que conduz à obesidade mórbida e intolerância a glicose), e os camundongos db/db (resistentes à insulina, hiperleptinêmicos e obesos). Entretanto, os modelos genéticos, além de requererem altos investimentos, não são precisamente capazes de reproduzir as condições fisiopatológicas que determinam a evolução da doença em humanos. Por esse motivo, modelos que promovem a associação de múltiplos fatores de risco são listados como uma alternativa plausível para o estudo da aterosclerose em roedores (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019; SAVOJI et al., 2019).

Os modelos não genéticos mais comuns para o estudo da aterosclerose envolvem a combinação de dieta hiperlipídica associada com a indução cirúrgica ou farmacológica de alterações cardiovasculares e/ou metabólicas (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019). O uso isolado de dieta hiperlipídica (88% de dieta padrão acrescida 2% de colesterol e 10% de banha) promove os eventos iniciais da doença, como leve espessamento da camada íntima e hipertrofia celular das camadas média e íntima da aorta (WU et al., 2010). A coadministração de altas doses de vitamina D3 (colecalfiferol) tem a finalidade de facilitar a indução de lesões vasculares e calcificações teciduais leves (DIAO et al., 2018; FU et al., 2017; GAO et al., 2017; GOU et al., 2018). Além disso, uma alternativa viável é a administração de drogas capazes de reduzir o metabolismo dos animais, como a droga antitireoidiana propiltiouracil (FU et al., 2017). Outros modelos ainda associam técnicas cirúrgicas com a dieta hiperlipídica, um

exemplo é a associação de hipertensão renovascular (2K1C), desnudamento do endotélio aórtico por raspagem do lúmen (através de um cateter inserido na artéria femoral esquerda) e tratamento com dieta hiperlipídica (SASAKI et al., 1994). Há ainda a opção de uso de dieta hiperlipídica (64,4% de dieta padrão, 0,5% de colesterol, 0,1% de colato de sódio, 5% de sacarose, 5% de banha, 5% de gordura hidrogenada e 20% de gema ovo em pó), metimazol e vitamina D3 em ratas com remoção cirúrgica dos ovários, o que mimetiza o quadro de menopausa em mulheres (GUARNIER et al., 2019).

Apesar dos avanços, nenhum modelo pré-existente foi capaz de reproduzir todos os estágios da aterosclerose em roedores. A maioria dos modelos não genéticos descritos na literatura envolvem combinações de dietas hiperlipídicas com a coadministração de vitamina D3 e/ou drogas antitireoidianas. No entanto, ainda existe uma falta de consenso em relação aos ingredientes e proporções exatas da dieta, tempo de exposição (variando entre 6 e 17 semanas), uso de adjuvantes e idade dos animais para o início dos protocolos. Dessa forma, nota-se uma lacuna na eficácia dos modelos não genéticos de aterosclerose em roedores, estimulando futuras pesquisas a aprimorar os modelos existentes e estabelecer um consenso de variáveis, que propiciarão contribuições expressivas para a prevenção, estadiamento e tratamento da doença (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019).

## **2.4 Plantas Medicinais**

Planta medicinal é qualquer planta, que contenha substâncias que podem ser usadas para o fim terapêutico, ou como precursoras para a síntese de drogas úteis. Com seu uso propagado ao longo dos séculos, ainda se apresentam como uma importante faceta nos cuidados a saúde de diversas populações. Estima-se que 10% de todas as plantas vasculares sejam usadas medicinalmente (GUTHOLD et al., 2018). Sua importância comercial é crescente. O comércio global de plantas medicinais ultrapassou US\$ 100 bilhões por ano em 2013, e entre 2008 e 2013, as vendas de plantas medicinais cresceram 25% na Europa, dobraram na China e triplicaram na Índia (SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013).

Segundo a Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, no Brasil, desde a década de 1970 há incentivo para o uso de plantas medicinais. Embora o desenvolvimento da medicina moderna seja bem estabelecido, os países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional, principalmente na atenção primária, uma vez que 85% dos seus habitantes utilizam plantas ou práticas da medicina tradicional para seus cuidados de saúde (BRASIL, 2016).

As plantas apresentam-se como um recurso importante no tratamento de doenças, seja em seu uso popular ou como substratos na indústria farmacêutica. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis no mercado seja proveniente de recursos naturais (3% de animais, 12% de microrganismos e 25% de plantas) (CALIXTO et al., 2001).

A atividade medicinal de cada planta está correlacionada com a presença de compostos bioativos classificados entre metabólitos primários e secundários (BRISKIN, 2000). Os metabólitos primários estão relacionados a processos metabólicos da planta (fotossíntese e transporte de solutos), dentre os quais pode-se citar as proteínas, nucleotídeos, clorofila e polissacarídeos (BALANDRIN et al., 1985). Em relação aos metabólitos secundários, existem três classes principais: compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos que contribuem com mais de 100.000 metabólitos secundários presentes somente no reino vegetal. Tais compostos desempenham função na interação entre planta e meio ambiente, atuando como defensores químicos da planta, e como perpetuadores da espécie no papel de atrativos e polinizadores (BRISKIN, 2000).

Os metabólitos secundários são usados como base para a produção de inúmeros medicamentos convencionais e fitoterápicos. Além disso, também possuem importante valor na indústria alimentícia, de cosméticos e agroquímica. Exemplos de metabólitos secundários amplamente explorados pela indústria são os alcaloides, terpenoides e fenilpropanoides (LI et al., 2020).

A biossíntese dos metabólitos secundários inicia-se nas vias básicas, como a da glicólise e posteriormente se diversifica, sendo influenciada pelo tipo celular, pelo estágio de desenvolvimentos e por fatores ambientais. Sendo assim, as diferentes células que compõem um tecido de uma planta medicinal podem possuir diferentes propriedades medicinais a depender do estágio de desenvolvimento. Sabendo que o desenvolvimento e crescimento das plantas é influenciado diretamente por condições ambientais (luminosidade, temperatura, disponibilidade de água, salinidade, etc) fica evidente que as adaptações morfológicas, bioquímicas e anatômicas propiciadas pelas mudanças bióticas ou abióticas influenciam também o acúmulo de metabólitos secundários (BARTWAL et al., 2013).

O uso de plantas medicinais incorpora não apenas o tratamento de doenças, mas também a prevenção. Os cuidados em saúde englobam de forma proativa, a promoção de saúde, a prevenção de doenças e o manejo de doenças crônicas. São consideradas medidas de prevenção primária, a promoção de saúde e a prevenção de doenças; e são consideradas medidas de prevenção secundárias e terciárias aquelas que se concentram no rastreamento e diagnóstico precoce,

e na prevenção de agravos e complicações, respectivamente (SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013).

Com cerca de 60 mil espécies vegetais catalogadas, e a maior diversidade vegetal do planeta, o Brasil ainda tem muito o que avançar em pesquisas científicas, visto que aproximadamente 1.100 espécies foram investigadas quanto as suas propriedades medicinais. Além da vasta biodiversidade, o país ainda conta com a diversidade cultural e étnica dos seus habitantes, o que resulta em grande acúmulo de conhecimentos e técnicas tradicionais (BRASIL, 2016).

## 2.5 *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke

*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke é uma das mais importantes espécies pertencentes ao gênero *Aloysia* Paláu da família Verbenaceae. É nativa da região sul da Bolívia e região norte da Argentina, sendo amplamente cultivada como planta ornamental e medicinal. A *A. polystachya* é popularmente conhecida como ka'á jaguá, burrito, té-burro, poleo-riojano, poleo-de-castilla, aloísia ou erva-serrana (MOHAMMADHOSSEINI et al., 2021). O nome do gênero - *Aloysia* - foi atribuído em homenagem a María Luisa de Parma (1751-1819), esposa do rei Carlos IV da Espanha. O epíteto específico *polystachya* significa 'muitos ramos', devido à planta possuir essa característica botânica (ALONSO e DESMARCHELIER, 2006).

A *A. polystachya* (Figura 1) é um arbusto com altura variando entre 0,5 e 1,5 m. Os caules têm entrenós curtos e são glabros quando maduros. As folhas são alternas, estreitamente lanceoladas-elípticas, medindo 1-5 × 0,3-1 cm, subsésseis, inteiras ao longo das margens, agudas a obtusas no ápice e agudas a atenuadas na base. As folhas, inflorescências e caules são amplamente utilizados na medicina popular na Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai (GONZÁLEZ et al., 2014; O'LEARY et al., 2016).



**Figura 1:** *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke. Planta em habitat.

Em países da América do Sul, a *A. polystachya* é tradicionalmente empregada para o tratamento de desordens respiratórias, neurológicas, cardiovasculares e gastrointestinais; como antiemético, antidermatótico, digestivo, analgésico, antihipertensivo e sedativo (CAMPOS-NAVARRO; SCARPA, 2013; FILIPOV, 1994; HELLIÓN-IBARROLA et al., 2006).

A infusão de folhas é tradicionalmente utilizada na região da Grande Dourados em Mato Grosso do Sul, Brasil, para tratar distúrbios digestivos e cardiovasculares. No Centro-Oeste do Brasil, é frequentemente adicionada ao tereré (bebida tradicional gelada), pois possui sabor mentolado e refrescante (COELHO et al., 2019). A espécie ainda consta no recém-publicado Formulário de Fitoterapia da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição, no qual a *A. polystachya* é indicada para o tratamento de sintomas dispépticos (como cólicas e distensão abdominal) e como ansiolítico fraco (ANVISA 2021). Costa de Melo et al. (2019) relataram que *A. polystachya* é usada na medicina popular para aliviar a ansiedade e a depressão. Usos populares semelhantes foram relatados por Del Vitto et al. (1997) e Hellión-Ibarrola et al. (2006). Filipov (1994), entrevistou índios Pilagá, pertencentes à família linguística Guaicuruyana, e citaram *A. polystachya* usando “as(e)na” como nome popular, relatando o uso medicinal da infusão/decoção das folhas para tratar dores gastrointestinais, resfriados e para o tratamento de tosse.

Outra pesquisa etnobotânica urbana feita na Argentina, entrevistou imigrantes bolivianos do mercado boliviano de Liniers. Os dados apontam que *A. polystachya* é utilizada para aromatizar bebidas, adicionada ao mate em sua forma fresca ou usada para fazer chás

medicinais. Entre os potenciais efeitos citados estavam a atividade sedativa, digestiva, antiespasmódica, hepatoprotetora, carminativa e antiemética (POCHETTINO et al., 2012).

Estudo semelhante realizado na Argentina com 100 migrantes paraguaios, relatou o uso popular de folhas de *A. polystachya* adicionadas no “mate” (versão quente) e “tereré” (versão fria), bebidas típicas preparadas com as folhas da *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. Os participantes informaram que a espécie é empregada para tratar problemas de digestão, dores de estômago e hipertensão (KUJAWSKA, 2018). Migrantes poloneses que vivem nos subtrópicos da Argentina cultivam amplamente a *A. polystachya* em quintais, a planta é consumida com o ‘mate’ para melhorar o sabor e como digestivo (KUJAWSKA; PARDO-DE-SANTAYANA, 2015).

Em pesquisa realizada na Argentina em materiais bibliográficos históricos e contemporâneos sobre o empacho (uma síndrome culturalmente ligada a um distúrbio digestivo), menciona propriedades terapêuticas antiespasmódicas, carminativas e hepáticas de *A. polystachya*. Além dos nomes populares citados anteriormente, o estudo cita “poleo de Castilla”, e descreve a espécie como uma das plantas mais citadas para tratar empacho, por decocção e ingestão de folhas (CAMPOS-NAVARRO; SCARPA, 2013).

Salm et al. (2021) realizaram um levantamento etnofarmacológico na Bolívia com 361 informantes de quatro etnias indígenas, e o uso popular de partes aéreas de *A. polystachya* foi citado pelo grupo Chiquitano na fase crônica da doença de Chagas para tratar sintomas cardiovasculares.

Estudos fitoquímicos realizados por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) em preparações de *A. polystachya* (folhas e partes aéreas) identificaram a prevalência de flavonoides e fenilpropanoides glicosilados, além de iridoides e nucleosídeos. Mohammadhosseini et al. (2021) realizaram estudos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação, e identificaram principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, incluindo os monoterpenos carvona, limoneno e  $\alpha$ -tujona, que foram observados com maior porcentagem relativa.

Os flavonoides presentes na *A. polystachya* incluem estruturas glicosiladas e não glicosiladas, sendo eles flavonóis, flavonas e flavan-3-óis. Por exemplo, os flavonóis quercetina, kaempferol e isorhamnetina; as flavonas apigenina e velutina; e os flavan-3-ols catequina e epigallocatequina. Os flavonoides e outros componentes fenólicos são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e na liberação do óxido nítrico, influenciando diretamente e indiretamente o tônus vascular e a pressão arterial (ACTIS-GORETTA; OTTAVIANI; FRAGA, 2006). Além disso, os glicosídeos (p.ex fenilpropanoides) também são comumente

encontrados em *A. polystachya*, estes incluem o acteosídeo e a rosidirina, que são constituintes relacionados com significativos efeitos antioxidantes (MARQUES et al., 2021).

Em relação aos ensaios farmacológicos, algumas atividades biológicas foram descritas para a espécie. A maioria dos estudos está focada em validar os usos etnofarmacológicos de *A. polystachya*. Um estudo *in vitro* avaliou a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *A. polystachya* utilizando o ensaio de capacidade antioxidante equivalente Trolox. Os autores mostraram que cada mililitro do extrato tem uma atividade antioxidante total equivalente a aproximadamente 0,83 mg de Trolox (AGUADO et al., 2013). Moller et al. (2020) avaliaram no mesmo estudo as atividades antioxidante e antiproliferativa do óleo essencial das folhas de *A. polystachya*. Os testes mostraram atividade antioxidante significativa quando comparados aos controles e efeitos antiproliferativos significativos contra três linhagens de células cancerígenas.

A atividade antibacteriana do óleo volátil de *A. polystachya* também foi avaliada. Os resultados mostraram atividade bactericida contra *Escherichia coli* ATCC 35218, bem como isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* sensíveis à meticilina (PÉREZ-ZAMORA et al., 2016). O extrato hidroalcoólico também apresentou atividade bactericida contra cepas de *Staphylococcus* (AGUADO et al., 2016).

Uma fração solúvel em etanol proveniente da infusão de *A. polystachya* foi administrada em SHR (30, 100 e 300 mg/kg) para investigar os efeitos cardioprotetores da espécie por via oral em um tratamento de 28 dias. Os resultados sugerem que o tratamento prolongado normalizou as alterações renais, eletrocardiográficas e hemodinâmicas induzidas pela hipertensão, e modulou positivamente a reatividade vascular arterial mesentérica e renal, evidenciando um efeito cardioprotetor significativo (MARQUES et al., 2021).

Hellión-Ibarrola et al. (2006) encontraram efeito ansiolítico para o extrato hidroetanólico obtido das folhas de *A. polystachya* por meio da ampliação da sedação induzida pelo pentobarbital. Os autores sugerem que a atividade ansiolítica é provavelmente mediada por outro mecanismo que não a modulação do sítio de ligação dos benzodiazepínicos nos receptores GABA<sub>A</sub>. Em 2008, o perfil antidepressivo do mesmo extrato e alguns componentes da fração acetato de etila foi mapeado. Sua atividade foi comprovada através de uma redução significativa do tempo de imobilidade de camundongos no teste de natação forçada (HELLIÓN-IBARROLA et al., 2008).

Um estudo comportamental também avaliou os efeitos da administração intraperitoneal do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. polystachya* em ratas Sprague–Dawley. Todas as

doses de extrato aumentaram a exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, com efeitos semelhantes ao observado com o diazepam. No teste de natação forçada, o efeito do extrato foi semelhante ao observado com a fluoxetina e a imipramina, reduzindo a imobilidade dos animais. Os autores sugerem que os componentes tujona e a carvona, entre outros, podem ter propriedades sedativas, ansiolíticas e antidepressivas (MORA et al., 2005).

Para confirmar os dados obtidos nos estudos pré-clínicos, foi realizado um ensaio clínico de fase 2, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com 54 pacientes adultos. O extrato hidroalcoólico de *A. polystachya* foi encapsulado e a maltodextrina foi utilizada como placebo. Os participantes foram instruídos a tomar uma cápsula (300 mg) duas vezes ao dia, durante 8 semanas. Os sintomas de ansiedade foram avaliados pela Escala de Avaliação de Ansiedade de Hamilton. Os resultados demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa nos escores da escala após quatro e oito semanas de tratamento, indicando um efeito ansiolítico significativo (CARMONA et al., 2019).

Os estudos que avaliaram a toxicidade da *A. Polystachya* são escassos, entretanto, existem dados que sugerem ausência de toxicidade para determinadas extrações. Marques *et al.* (2021) avaliaram a toxicidade da fração solúvel em etanol de folhas e caule de *A. polystachya*. Uma dose única de 2.000 mg/kg foi oralmente administrada para ratas Wistar fêmeas e os animais foram observados periodicamente durante duas semanas. Não foram observados sinais de toxicidade aguda nem letalidade. Da mesma forma, Hellión-Ibarrola *et al.* (2006), utilizando partes aéreas de *A. Polystachya*, produziram um extrato hidroetanólico e administraram as doses de 30, 100, 300, 600 e 1.000 mg/kg via intraperitoneal, e as doses de 100, 300, 600, 1.000, 2.000 e 3.000 mg/kg via oral a camundongos machos albinos suíços. Os animais foram observados periodicamente durante duas semanas e nenhuma evidência de toxicidade foi observada em todas as doses testadas.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL

Desenvolver e validar um modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular em ratos, associando HAS, hipotireoidismo e dislipidemia (etapa 1) e avaliar os efeitos cardioprotetores de *Aloysia polystachya* utilizando um modelo experimental de IAM (etapa 2) e outro de múltiplos fatores de risco cardiovascular (etapa 3).



## ESPECÍFICOS

### Etapa 1:

- Induzir a hipertensão renovascular (2K1C) em ratos Wistar;
- Induzir o hipotireoidismo por meio de tireoidectomia em diferentes animais hipertensos, incluindo ratos SHR e 2K1C;
- Induzir a dislipidemia por meio de tratamento com dieta hiperlipídica;
- Mensurar o volume urinário, o pH, a densidade, e a excreção de eletrólitos e creatinina nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a atividade elétrica cardíaca (por meio do eletrocardiograma) e a pressão arterial sistólica, diastólica, média e a frequência cardíaca (pelo método direto nos diferentes grupos experimentais);
- Investigar a reatividade vascular em leito mesentérico isolado e perfundido sob a administração de diferentes substâncias vasoativas;
- Mensurar diferentes parâmetros bioquímicos séricos;
- Avaliar histologicamente e morfometricamente as amostras de coração, rim, fígado e artérias subclávia e carótida obtidas dos diferentes grupos experimentais;
- Identificar o grupo mais efetivo para a validação do modelo experimental.

### Etapa 2

- Investigar a composição fitoquímica do óleo essencial produzido a partir das folhas de *Aloysia polystachya*;
- Identificar as três doses de tratamento, a partir dos relatos de uso popular da espécie;
- Avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial de *A. polystachya* em ratos;
- Induzir o hipotireoidismo cirúrgico em ratos SHR;
- Induzir dislipidemia por meio de uma dieta hiperlipídica;
- Realizar o tratamento com três diferentes doses do óleo essencial de *A. polystachya*, por 42 dias;
- Mensurar o volume urinário, o pH, a densidade, e a excreção de eletrólitos e creatinina nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a atividade elétrica cardíaca (por meio do eletrocardiograma) e a pressão arterial sistólica, diastólica, média e a frequência cardíaca (pelo método direto nos diferentes grupos experimentais);
- Investigar a reatividade vascular em leito mesentérico isolado e perfundido sob a administração de diferentes substâncias vasoativas;

- Mensurar diferentes parâmetros bioquímicos séricos;
- Avaliar histologicamente e morfometricamente as amostras de coração, rim, fígado e artérias subclávia e carótida obtidas dos diferentes grupos experimentais.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J. I.; FRAGA, C. G. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Flavanol-Rich Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 229–234, 1 jan. 2006.

AGUADO, M. I. et al. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). **Revista mexicana de ciencias farmacéuticas**, v. 44, n. 3, p. 46–51, set. 2013.

AGUADO, M. I. et al. Antioxidant and antibacterial activities of hydroalcoholic extracts from *Aloysia polystachya* griseb moldenke and *Lippia turbinata* griseb (verbenaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, p. 393–395, 1 mar. 2016.

ALONSO, J., e C. DESMARCHELIER. 2006. **Plantas medicinales autóctonas de la Argentina**. 2nd ed., Argentina: Ediciones Fitociencia. pp.88, 89, 91.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos: Farmacopeia Brasileira, 2nd ed. Brasília, 2021.

ARNETT, D. K. et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 10, p. e177–e232, 10 set. 2019.

BALANDRIN, M. F. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science (New York, N.Y.)**, v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 7 jun. 1985.

BANCKS, M. P. et al. Long-term Absolute Risk for Cardiovascular Disease Stratified by Fasting Glucose Level. **Diabetes Care**, v. 42, n. 3, p. 457–465, 7 jan. 2019.

BARTWAL, A. et al. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 216–232, 1 mar. 2013.

BAYS, H. E. Adiposopathy: Is “Sick Fat” a Cardiovascular Disease? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 25, p. 2461–2473, 21 jun. 2011.

BAYS, H. E. et al. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. **American Journal of Preventive Cardiology**, v. 5, p. 100149, 23 jan. 2021.

BECHTHOLD, A. et al. Food groups and risk of coronary heart disease, stroke and heart failure: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 7, p. 1071–1090, 12 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p, 2016.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 507–514, out. 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261–279, out. 2001.

CAMPOS-NAVARRO, R.; SCARPA, G. F. The cultural-bound disease “empacho” in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 349–360, 9 jul. 2013.

CAO, Q. et al. Waist-hip ratio as a predictor of myocardial infarction risk. **Medicine**, v. 97, n. 30, p. e11639, 27 jul. 2018.

CARMONA, F. et al. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112060, 5 out. 2019.

CETNAR, A. D. et al. Patient-Specific 3D Bioprinted Models of Developing Human Heart. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 15, p. 2001169, 1 ago. 2021.

CHIMPANZEE SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. **Nature**, v. 437, n. 7055, p. 69–87, 1 set. 2005.

COCHRANE, S. K. et al. Association of Accelerometry-Measured Physical Activity and Cardiovascular Events in Mobility-Limited Older Adults: The LIFE (Lifestyle Interventions and Independence for Elders) Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 12, p. e007215, 2017.

COELHO, F. C. et al. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Religion and Health**, v. 58, n. 2, p. 572–588, 1 abr. 2019.

COOK, N. R. et al. Joint Effects of Sodium and Potassium Intake on Subsequent Cardiovascular Disease: The Trials of Hypertension Prevention Follow-up Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 1, p. 32–40, 12 jan. 2009.

COSTA DE MELO, N. et al. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 106, 11 jul. 2019.

D’AGOSTINO, R. B. et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743–753, 12 fev. 2008.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Informações em saúde, epidemiológicas e de morbidade: banco de dados. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defetohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 05 jul. 2022

DEL VITTO, L.A., PETENATTI, E.M., PETENATTI, M.E. **Recursos Herbolarios de San Luis (Republica Argentina)**. Primera parte: Plantas Nativas. *Multequina* 6, 49–66, 1997.

DIAO, S.L. et al. Influence of crocetin on high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats via anti-oxidant activity together with inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 493–499, mar. 2018.

DU, H. et al. Fresh Fruit Consumption and Major Cardiovascular Disease in China. research-article. **New England Journal of Medicine**. v. 374, n.14, p 1332-1343, 07 abr. 2016

EINARSON, T. R. et al. Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 21, n. 7, p. 881–890, 1 jul. 2018.

EMMERT, M. Y.; HITCHCOCK, R. W.; HOERSTRUP, S. P. Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Innovative tissue models for drug discovery and development. v. 69–70, p. 254–269, 20 abr. 2014.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, p. 1–76, ago. 2017.

FARZADFAR, F. et al. National, regional, and global trends in serum total cholesterol since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 321 country-years and 3·0 million participants. **The Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 578–586, 12 fev. 2011.

FILIPOV, A. Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 181–193, 1 dez. 1994.

FOX, C. S. et al. Lifetime Risk of Cardiovascular Disease Among Individuals With and Without Diabetes Stratified by Obesity Status in the Framingham Heart Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 8, p. 1582–1584, 1 ago. 2008.

FU, W.-J. et al. Anti-atherosclerosis and cardio-protective effects of the Angong Niu Huang Pill on a high fat and vitamin D3 induced rodent model of atherosclerosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 118–126, 4 jan. 2017.

GAO, M. et al. Establishment of a rat model with diet-induced coronary atherosclerosis. **Journal of Biomedical Research**, v. 31, n. 1, p. 47–55, jan. 2017.

GOLDBLATT, H. et al. Studies on experimental hypertension. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–379, 28 fev. 1934.

GONZÁLEZ, Y. et al. Etnofarmacobotánica foliar de “Burrito”, *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke (verbenaceae), cultivado en Paraguay. **Rojasiana**, p. 31–41, 2014.

GOU, S.-H. et al. Anti-atherosclerotic effect of *Fermentum Rubrum* and *Gynostemma pentaphyllum* mixture in high-fat emulsion- and vitamin D3-induced atherosclerotic rats. **Journal of the Chinese Medical Association: JCMA**, v. 81, n. 5, p. 398–408, maio 2018.

GRØNTVED, A. et al. Bicycling to Work and Primordial Prevention of Cardiovascular Risk: A Cohort Study Among Swedish Men and Women. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 11, p. e004413, 2016.

GUARNIER, L. P. et al. Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 664, nov. 2019.

GUASCH-FERRÉ, M. et al. Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 20, p. 2519–2532, 14 nov. 2017.

GUTHOLD, R. et al. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1·9 million participants. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 10, p. e1077–e1086, 1 out. 2018.

HARRISON, S. L. et al. Cardiovascular risk factors, cardiovascular disease, and COVID-19: an umbrella review of systematic reviews. **European Heart Journal. Quality of Care & Clinical Outcomes**, v. 7, n. 4, p. 330–339, 9 jun. 2021.

HELLIÓN-IBARROLA, M. C. et al. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 3, p. 400–408, 24 maio 2006.

HELLIÓN-IBARROLA, M. C. et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6, p. 478–483, 20 jun. 2008.

JAYEDI, A. et al. Dietary sodium, sodium-to-potassium ratio, and risk of stroke: A systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 1092–1100, 1 jun. 2019.

JIALAL, I.; SINGH, G. Management of diabetic dyslipidemia: An update. **World Journal of Diabetes**, v. 10, n. 5, p. 280–290, 15 maio 2019.

KHAN, S. S. et al. Association of Body Mass Index With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Compression of Morbidity. **JAMA Cardiology**, v. 3, n. 4, p. 280–287, abr. 2018.

KRAUS, W. E. et al. Daily Step Counts for Measuring Physical Activity Exposure and Its Relation to Health. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 51, n. 6, p. 1206–1212, jun. 2019.

KUJAWSKA, M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the Intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2018, p. 6849317, 14 mar. 2018.

KUJAWSKA, M.; PARDO-DE-SANTAYANA, M. Management of medicinally useful plants by European migrants in South America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 347–355, 22 ago. 2015.

LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

LERMAN, L. O. et al. Animal Models of Hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 73, n. 6, p. e87–e120, jun. 2019.

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 1 mar. 2020.

LIU, X. et al. Dose–Response Association Between Physical Activity and Incident Hypertension. **Hypertension**, v. 69, n. 5, p. 813–820, 1 maio 2017.

LIVERO, F. A. D. R.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Non-genetic rats models for atherosclerosis research: from past to present. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 11, n. 2, p. 203–213, 1 jun. 2019.

MARQUES, A. A. M. et al. Ethnopharmacological investigation of the cardiovascular effects of the ethanol-soluble fraction of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke leaves in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 274, p. 114077, 28 jun. 2021.

MICHA, R.; WALLACE, S. K.; MOZAFFARIAN, D. Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 121, n. 21, p. 2271–2283, 1 jun. 2010.

MILLS, K. T. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-based Studies from 90 Countries. **Circulation**, v. 134, n. 6, p. 441–450, 9 ago. 2016.

MOHAMMADHOSSEINI, M. et al. An overview of the genus *Aloysia Paláu* (Verbenaceae): Essential oil composition, ethnobotany and biological activities. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 11 abr. 2021.

MOLLER, A. C. et al. Antioxidant and Anti-Proliferative Activity of Essential Oil and Main Components from Leaves of *Aloysia polystachya* Harvested in Central Chile. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 131, 30 dez. 2020.

MORA, S. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 2, p. 373–378, 1 out. 2005.

MOZAFFARIAN, D. et al. Global Sodium Consumption and Death from Cardiovascular Causes. **New England Journal of Medicine**. v.14, n. 7 p. 624-34, ago, 2014.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 30 ago. 2014.

NGUYEN, T. N.; CHOW, C. K. Global and national high blood pressure burden and control. **The Lancet**, v. 398, n. 10304, p. 932–933, 11 set. 2021.

O’LEARY, N. et al. Taxonomic Revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae) in South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 101, n. 3, p. 568–609, 27 abr. 2016.

PANDEY, A. et al. Dose–Response Relationship Between Physical Activity and Risk of Heart Failure. **Circulation**, v. 132, n. 19, p. 1786–1794, 10 nov. 2015.

PÉREZ-ZAMORA, C. M. et al. Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae) r. v. 15, p. 199–215, 2016.

POCHETTINO, M. L. et al. Functional Foods and Nutraceuticals in a Market of Bolivian Immigrants in Buenos Aires (Argentina). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2012, p. 320193, 2012.

PRÉCOMA, D. B. et al. Updated Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2019.

REYNOLDS, A. et al. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. **The Lancet**, v. 393, n. 10170, p. 434–445, 2 fev. 2019.

ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 22 dez. 2020.

ROTH, G. A. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736–1788, 10 nov. 2018.

SALM, A. et al. Phylobioactive hotspots in plant resources used to treat Chagas disease. **iScience**, v. 24, n. 4, p. 102310, 15 mar. 2021.

SASAKI, S. et al. Association of blood pressure variability with induction of atherosclerosis in cholesterol-fed rats. **American Journal of Hypertension**, v. 7, n. 5, p. 453–459, maio 1994.

SAVOJI, H. et al. Cardiovascular disease models: A game changing paradigm in drug discovery and screening. **Biomaterials**, Organoids and Ex Vivo Tissue On-Chip Technologies. v. 198, p. 3–26, 1 abr. 2019.

SCHWINGSHACKL, L. et al. An Umbrella Review of Nuts Intake and Risk of Cardiovascular Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 7, p. 1016–1027, 2017.

SOFOFORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 10, n. 5, p. 210–229, 12 ago. 2013.

SULIGA, E. et al. Consumption of Alcoholic Beverages and the Prevalence of Metabolic Syndrome and Its Components. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2764, nov. 2019.

TRIPATHY, D. et al. Mild Physiologic Hyperglycemia Induces Hepatic Insulin Resistance in Healthy Normal Glucose-Tolerant Participants. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 7, p. 2842–2850, 21 fev. 2019.

UAUY, R. et al. WHO Scientific Update on trans fatty acids: summary and conclusions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 2, p. S68–S75, maio 2009.

VERNERREY, F. J. et al. Mechanics of 3D Cell–Hydrogel Interactions: Experiments, Models, and Mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 18, p. 11085–11148, 22 set. 2021.

VIRANI, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. **Circulation**, v. 143, n. 8, p. e254–e743, 23 fev. 2021.

VOS, T. et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 17 out. 2020.

WANG, X. et al. Association of Cardiovascular Health With Life Expectancy Free of Cardiovascular Disease, Diabetes, Cancer, and Dementia in UK Adults. **JAMA Internal Medicine**, v. 183, n. 4, p. 340–349, 1 abr. 2023.

WANG, X. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ**, v. 349, p. g4490, 29 jul. 2014.

WEWEGE, M. A. et al. Aerobic, resistance or combined training: A systematic review and meta-analysis of exercise to reduce cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v. 274, p. 162–171, 1 jul. 2018.

WHELTON, S. P. et al. Association of Normal Systolic Blood Pressure Level With Cardiovascular Disease in the Absence of Risk Factors. **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 9, p. 1011–1018, set. 2020.

WILKINS, J. T. et al. Lifetime Risk and Years Lived Free of Total Cardiovascular Disease. **JAMA**, v. 308, n. 17, p. 1795–1801, 7 nov. 2012.

WILLIAMS, B. et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). **European Heart Journal**, v. 39, n. 33, p. 3021–3104, 1 set. 2018.

WU, J. et al. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1367–1375, out. 2010.

ZHANG, X. et al. Iris domestica (iso)flavone 7- and 3'-O-Glycosyltransferases Can Be Induced by CuCl<sub>2</sub>. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 9 fev. 2021.



## 5 APÊNDICES

**Artigo 1: Revista Pharmaceuticals (FI 4.6)**

<https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/instructions>



## Article

# A New Approach for the Development of Multiple Cardiovascular Risk Factors in Two Rat Models of Hypertension

Karyne Garcia Tafarelo Moreno <sup>1</sup> , Aline Aparecida Macedo Marques <sup>1</sup>, Gabriela Pereira da Silva <sup>1</sup> , Bethânia Rosa Lourençone <sup>1</sup>, Clara Soligo Fortini <sup>1</sup>, Patrícia Regina Terço Leite <sup>1</sup>, Ariany Carvalho dos Santos <sup>2</sup>, Roosevelt Isaías Carvalho Souza <sup>2</sup>, Leila Isabel da Siva <sup>3</sup> and Arquimedes Gasparotto Junior <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFAC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados 79825-070, Brazil; karynetafarelo@gmail.com (K.G.T.M.); alinemarkes\_nutri@hotmail.com (A.A.M.M.); gabii.pereira6@gmail.com (G.P.d.S.); bethania.lorencone041@academico.ufgd.edu.br (B.R.L.); clarasfortini@outlook.com (C.S.F.); patricialeitesk@gmail.com (P.R.T.L.)

<sup>2</sup> Laboratory of Histopathology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados 79825-070, Brazil; arianysantos@ufgd.edu.br (A.C.d.S.); rooseveltsouza@ufgd.edu.br (R.I.C.S.)

<sup>3</sup> Post-Graduate Program in Biotechnology Applied to Agriculture, Paranaense University, Umuarama 87502-210, Brazil; leilaambientalmk25@hotmail.com

\* Correspondence: arquimedesjunior@ufgd.edu.br; Tel.: +55-(67)-3410-2333; Fax: +55-(67)-3410-2321



**Citation:** Moreno, K.G.T.; Marques, A.A.M.; da Silva, G.P.; Lourençone, B.R.; Fortini, C.S.; Leite, P.R.T.; dos Santos, A.C.; Souza, R.I.C.; da Siva, L.I.; Gasparotto Junior, A. A New Approach for the Development of Multiple Cardiovascular Risk Factors in Two Rat Models of Hypertension. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 853. <https://doi.org/10.3390/ph15070853>

Academic Editor: Yuhei Nishimura

Received: 23 May 2022

Accepted: 7 July 2022

Published: 12 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death among non-communicable diseases. There is a lack of valid animal models that mimic associations among multiple cardiovascular risk factors in humans. The present study developed an animal model that uses multiple cardiovascular risk factors—namely, hypertension, hypothyroidism, and a high-fat diet (HFD). Two models of hypertension were used: renovascular hypertension (two-kidney, one clip [2K1C]) and spontaneously hypertensive rats (SHRs). The naive group was composed of normotensive rats. Twelve weeks after surgery to induce renovascular hypertension, rats in the 2K1C and SHR groups underwent thyroidectomy. The HFD was then implemented for 6 weeks. Renal function, serum redox status, biochemical CVD markers, electrocardiographic profile, blood pressure, mesenteric vascular bed reactivity, histopathology, and morphometry were investigated. Both experimental models induced dyslipidemia, renal function impairment, and hepatic steatosis, accompanied by higher levels of different inflammatory markers and serum oxidative stress. These alterations contributed to end-organ damage in all hypertensive rats. Our findings corroborate a viable alternative model that involves multiple cardiovascular risk factors and resembles conditions that are seen in humans. Both models mimicked CVD, but our data show that SHRs exhibit more significant pathophysiological changes.

**Keywords:** animal models; cardiovascular disease; dyslipidemia; renal impairment

## 1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death among non-communicable diseases globally, corresponding to an estimated 17.8 million deaths in 2017. Deaths from CVD increased by 21.1%, but death rates decreased from 259.9 to 233.1 deaths per 100,000 population in 10 years [1].

Understanding cardiovascular risk factors is fundamental for the prevention, detection, and control of CVD [2]. These risk factors include unhealthy nutrition, physical inactivity, dyslipidemia, hyperglycemia, high blood pressure, obesity, endocrine metabolic dysfunction, older age, smoking, and kidney dysfunction, with sex differences and associations with race/ethnicity [3].

Hypertension is characterized by persistently high systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) in systemic arteries. For the outpatient diagnosis, SBP and DBP must be  $\geq 140$  and 90 mmHg, respectively [4]. Several etiologies can underlie hypertension. Most patients (90–95%) have highly heterogeneous essential hypertension with multifactorial gene–environment etiology [5]. Hypertension rarely occurs in isolation and often coexists with other cardiovascular/metabolic risk factors, such as dyslipidemia and glucose intolerance [4].

Hypertension and dyslipidemia can significantly damage the vascular endothelium, leading to impairments in vasomotor activity and creating a feedback loop that aggravates the progression of hypertension and atherosclerotic disease [6]. In addition to genetic conditions, both hypertension and dyslipidemia are possibly influenced by an unhealthy diet. Positive caloric balance and high body fat are independent risk factors for CVD. Diets with high levels of saturated fat, cholesterol, sodium, sugar, and alcohol are associated with a higher risk of CVD [3]. Nutrient metabolism and body weight can also be disturbed by changes in thyroid hormones. Thyroid hormones regulate cardiac gene expression and influence nitric oxide production and vascular tone. Thus, hypertension, dyslipidemia, and hypothyroidism constitute an important deleterious triad that impacts the cardiovascular system [7].

We identified an important gap in animal models that are useful for studying associations among multiple risk factors that are related to the genesis and exacerbation of CVD. Such models would be plausible alternatives to mimic conditions that are prevalent in human patients [8,9]. The main objective of the present study was to develop an animal model that involves multiple risk factors for CVD that are associated with hypertension, hypothyroidism, and dyslipidemia in male rats.

## 2. Results

### 2.1. Behavioral Pattern and Body Weight Gain

Behavioral patterns and body weight gain were not significantly different between the naive, two-kidney-one-clip (2K1C), and spontaneous hypertensive rat (SRH) groups (data not shown).

### 2.2. Renal Function

Urinary parameters in the different experimental groups are shown in Table 1. pH significantly decreased in all groups that were fed the high-fat diet (HFD). Urinary density significantly increased in the 2K1C group, compared with that in the naive group. Levels of urinary chloride, potassium, sodium, and creatinine significantly decreased in the 2K1C and SHR groups, compared with the levels of those parameters in the naive group.

**Table 1.** Urinary parameters of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

| Parameter                         | Naive                | 2K1C                            | SHR                             |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Urinary volume (mL/100 g/24 h)    | 30.83 $\pm$ 6.82     | 23.26 $\pm$ 4.67                | 26.63 $\pm$ 8.00                |
| pH                                | 8.01 $\pm$ 0.44      | 7.44 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>    | 7.19 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>    |
| Density                           | 1015 $\pm$ 7.81      | 1025 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup>    | 1023 $\pm$ 4.42                 |
| Chloride ( $\mu$ mol/100 g/24 h)  | 1033.12 $\pm$ 121.22 | 657.12 $\pm$ 85.21 <sup>a</sup> | 700.66 $\pm$ 34.32 <sup>a</sup> |
| Potassium ( $\mu$ mol/100 g/24 h) | 844.21 $\pm$ 85.11   | 534.23 $\pm$ 56.23 <sup>a</sup> | 602.11 $\pm$ 45.66 <sup>a</sup> |
| Sodium ( $\mu$ mol/100 g/24 h)    | 1311.61 $\pm$ 178.11 | 855.21 $\pm$ 87.34 <sup>a</sup> | 867.14 $\pm$ 77.66 <sup>a</sup> |
| Urea (mg/100 g/24 h)              | 105.51 $\pm$ 25.22   | 109.12 $\pm$ 22.31              | 111.22 $\pm$ 30.11              |
| Creatinine (mg/100 g/24 h)        | 2.66 $\pm$ 0.36      | 1.33 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>    | 1.55 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>    |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean  $\pm$  SEM).  $n = 8$  rats per group. <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with naive group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; SHR: spontaneously hypertensive rat.

### 2.3. Electrocardiography

Electrocardiographic parameters in the different experimental groups at the end of 6 weeks of the HFD are shown in Table 2. The SHR group exhibited significant increases in QT and QTC segments, compared with the naive group. All other electrocardiographic parameters did not change in any of the experimental groups.

**Table 2.** Electrocardiographic parameters of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

| Parameter        | Naive          | 2K1C           | SHR                         |
|------------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| P segment (ms)   | 31.75 ± 6.20   | 32.38 ± 7.05   | 37.33 ± 6.30                |
| PR segment (ms)  | 41.00 ± 5.75   | 38.75 ± 10.79  | 44.00 ± 8.54                |
| QRS segment (ms) | 45.50 ± 4.95   | 54.88 ± 9.09   | 54.33 ± 8.68                |
| QT segment (ms)  | 98.75 ± 11.56  | 113.50 ± 12.68 | 145.40 ± 16.74 <sup>a</sup> |
| QTC segment (ms) | 165.40 ± 42.19 | 176.40 ± 24.80 | 245.40 ± 36.92 <sup>a</sup> |
| P wave (mV)      | 0.04 ± 0.02    | 0.03 ± 0.01    | 0.05 ± 0.01                 |
| Q wave (mV)      | −0.01 ± 0.01   | −0.05 ± 0.09   | −0.02 ± 0.02                |
| R wave (mV)      | 0.28 ± 0.05    | 0.25 ± 0.09    | 0.31 ± 0.05                 |
| S wave (mV)      | −0.001 ± 0.001 | −0.001 ± 0.001 | −0.001 ± 0.001              |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean ± SEM). *n* = 8 rats per group. <sup>a</sup> *p* ≤ 0.05 when compared with naive group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; SHR: spontaneously hypertensive rat.

### 2.4. Blood Pressure and Heart Rate

The 2K1C and SHR groups had significantly higher SBP, DBP, and mean arterial pressure (MAP) than the naive group. The 2K1C and SHR groups had significantly lower heart rates (HR) than the naive group (Table 3).

**Table 3.** Blood pressure and heart rates of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

| Parameter   | Naive          | 2K1C                        | SHR                         |
|-------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| SBP (mm Hg) | 98.60 ± 24.27  | 164.10 ± 24.76 <sup>a</sup> | 144.80 ± 10.10 <sup>a</sup> |
| DBP (mm Hg) | 63.79 ± 3.61   | 100.95 ± 14.50 <sup>a</sup> | 99.39 ± 7.86 <sup>a</sup>   |
| MAP (mm Hg) | 80.22 ± 16.05  | 121.56 ± 12.39 <sup>a</sup> | 115.79 ± 8.22 <sup>a</sup>  |
| HR (bpm)    | 246.00 ± 11.56 | 178.60 ± 20.42 <sup>a</sup> | 153.00 ± 21.88 <sup>a</sup> |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean ± SEM). *n* = 8 rats per group. <sup>a</sup> *p* ≤ 0.05 when compared with naive group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; SBP: systolic blood pressure; SHR: spontaneously hypertensive rat.

### 2.5. Mesenteric Vascular Bed Reactivity

Vascular reactivity in the mesenteric vascular bed (MVB) in the different experimental groups is shown in Table 4. All animals in the SHR group exhibited a significant reduction in the phenylephrine (Phe; 3, 10, and 30 nmol)-induced vasoconstrictor response compared with those in the naive group. All other parameters did not significantly change.

**Table 4.** Mesenteric vascular reactivity of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

| Parameter         | Naive         | 2K1C          | SHR                       |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------------|
| <i>Phe</i> (nmol) |               |               |                           |
| 3                 | 17.90 ± 7.92  | 8.96 ± 5.47   | 3.52 ± 1.93 <sup>a</sup>  |
| 10                | 39.23 ± 8.07  | 24.90 ± 11.11 | 17.08 ± 7.49 <sup>a</sup> |
| 30                | 76.90 ± 12.13 | 57.38 ± 21.90 | 36.83 ± 9.40 <sup>a</sup> |

Table 4. Cont.

| Parameter  | Naive          | 2K1C          | SHR           |
|------------|----------------|---------------|---------------|
| 100        | 102.74 ± 21.98 | 94.66 ± 28.64 | 78.05 ± 31.29 |
| ACh (nmol) |                |               |               |
| 0.3        | −5.06 ± 1.19   | −3.70 ± 1.20  | −5.06 ± 1.72  |
| 1          | −5.93 ± 1.90   | −5.59 ± 2.05  | −7.71 ± 2.98  |
| 3          | −6.35 ± 2.05   | −4.96 ± 2.76  | −4.21 ± 1.97  |
| 10         | −6.04 ± 2.66   | −6.34 ± 2.18  | −7.60 ± 1.54  |
| SNP (nmol) |                |               |               |
| 0.03       | −6.18 ± 2.52   | −7.12 ± 2.18  | −8.70 ± 3.56  |
| 0.1        | −9.74 ± 3.39   | −7.62 ± 2.50  | −8.07 ± 4.33  |
| 0.3        | −14.50 ± 4.82  | −17.85 ± 3.13 | −15.58 ± 3.81 |
| 1          | −22.72 ± 8.00  | −19.44 ± 6.78 | −19.76 ± 6.79 |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean ± SEM). *n* = 8 rats per group. <sup>a</sup> *p* ≤ 0.05 when compared with naive group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; ACh: acetylcholine; Phe: phenylephrine; SHR: spontaneously hypertensive rat; SNP: sodium nitroprusside.

## 2.6. Blood Analyses

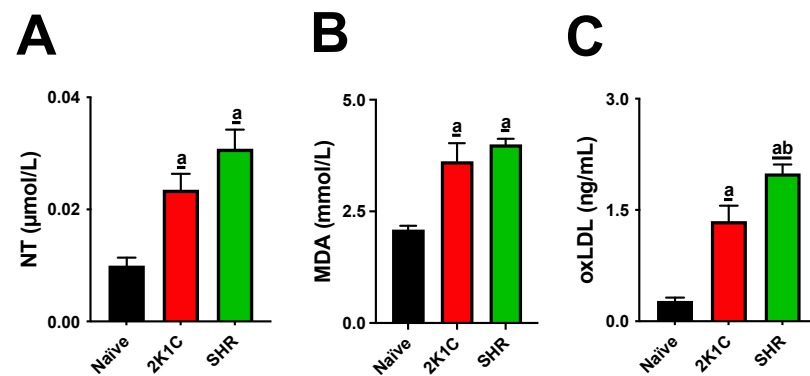
Alanine aminotransferase (ALT) levels significantly increased in the 2K1C group compared with its levels in the naive group (Table 5). Serum lipid levels, including triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), significantly increased in the 2K1C and SHR groups compared with the levels observed in the naive group. The SHR group had significantly higher serum total cholesterol and LDL-C than the 2K1C group (Table 5). Serum urea levels in the 2K1C and SHR groups were significantly higher than those in the naive group. The SHR group had significantly lower serum creatinine levels than the 2K1C group (Table 5).

Table 5. Biochemical parameters of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

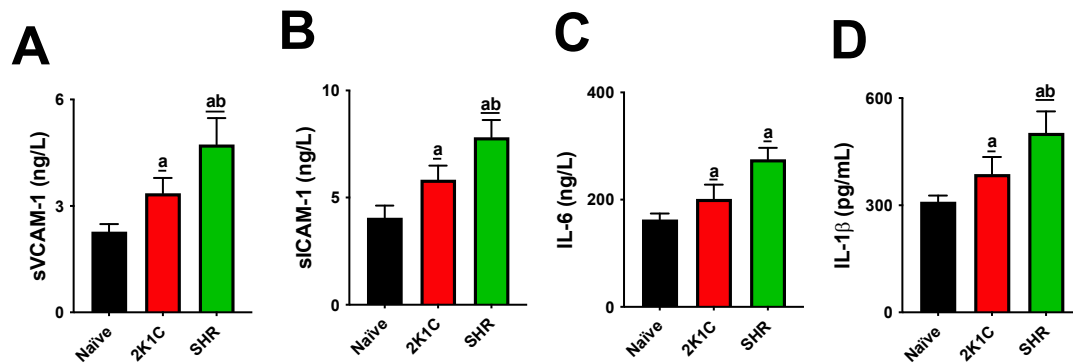
| Parameter                 | Naive          | 2K1C                        | SHR                          |
|---------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| AST (U/L)                 | 193.40 ± 62.51 | 205.00 ± 61.02              | 183.40 ± 49.51               |
| ALT (U/L)                 | 56.00 ± 12.46  | 92.67 ± 10.99 <sup>a</sup>  | 73.57 ± 11.12                |
| Triglycerides (mg/dL)     | 18.75 ± 6.65   | 492.7 ± 143.20 <sup>a</sup> | 551.20 ± 160.00 <sup>a</sup> |
| Total cholesterol (mg/dL) | 89.40 ± 17.17  | 127.20 ± 14.96 <sup>a</sup> | 175.20 ± 17.03 <sup>ab</sup> |
| HDL-C (mg/dL)             | 31.00 ± 10.32  | 28.67 ± 15.10               | 22.14 ± 8.97                 |
| LDL-C (mg/dL)             | 66.65 ± 10.64  | 102.33 ± 15.34 <sup>a</sup> | 215.40 ± 7.07 <sup>ab</sup>  |
| VLDL-C (mg/dL)            | 3.20 ± 1.69    | 98.53 ± 28.64 <sup>a</sup>  | 123.00 ± 8.03 <sup>a</sup>   |
| Urea (mg/dL)              | 27.75 ± 3.59   | 44.33 ± 7.39 <sup>a</sup>   | 38.60 ± 6.91 <sup>a</sup>    |
| Creatinine (mg/dL)        | 0.70 ± 0.21    | 0.90 ± 0.12                 | 0.58 ± 0.13 <sup>b</sup>     |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean ± SEM). *n* = 8 rats per group. <sup>a</sup> *p* ≤ 0.05 when compared with naive group. <sup>b</sup> *p* ≤ 0.05 when compared with 2K1C group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; SHR: spontaneously hypertensive rat.

The SHR and 2K1C groups had significantly higher nitrotyrosine (NT), malondialdehyde (MDA), and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) levels than the naive group. Levels of oxLDL in the SHR group were significantly higher than those in the 2K1C group (Figure 1). All rats in the SHR group had higher levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interleukin-6 (IL-6), and IL-1β than the rats in the naive group. The SHR group also had significantly higher sVCAM-1, sICAM-1, IL-6, and IL-1β levels than the 2K1C group (Figure 2).



**Figure 1.** Oxidative/nitrosative stress markers in normotensive and hypertensive high-fat-fed rats. Serum nitrotyrosine (A), malondialdehyde (B), and oxidized low-density lipoprotein levels (C) are presented. The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with naive; <sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with 2K1C group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; MDA: malondialdehyde; NT: nitrotyrosine; oxLDL: oxidized low-density lipoprotein; SHR: spontaneously hypertensive rats.



**Figure 2.** Serum interleukins and soluble adhesion molecule levels in normotensive and hypertensive high-fat-fed rats. Serum sVCAM-1 (A), sICAM-1 (B), IL-6 (C), and IL-1β (D) levels are shown. The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with naive; <sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with 2K1C group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; IL-1β: interleukin-1β; IL-6: interleukin-6; SHR: spontaneously hypertensive rats; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1.

## 2.7. Relative Organ Weight

The SHR and 2K1C groups had significantly higher heart and liver relative weights than the naive group. The relative weight of the right kidney was not altered in any of the experimental groups (Table 6).

**Table 6.** Relative organ weight and cardiac morphometry of the different experimental groups at the end of 6 weeks of treatment with the high-fat diet.

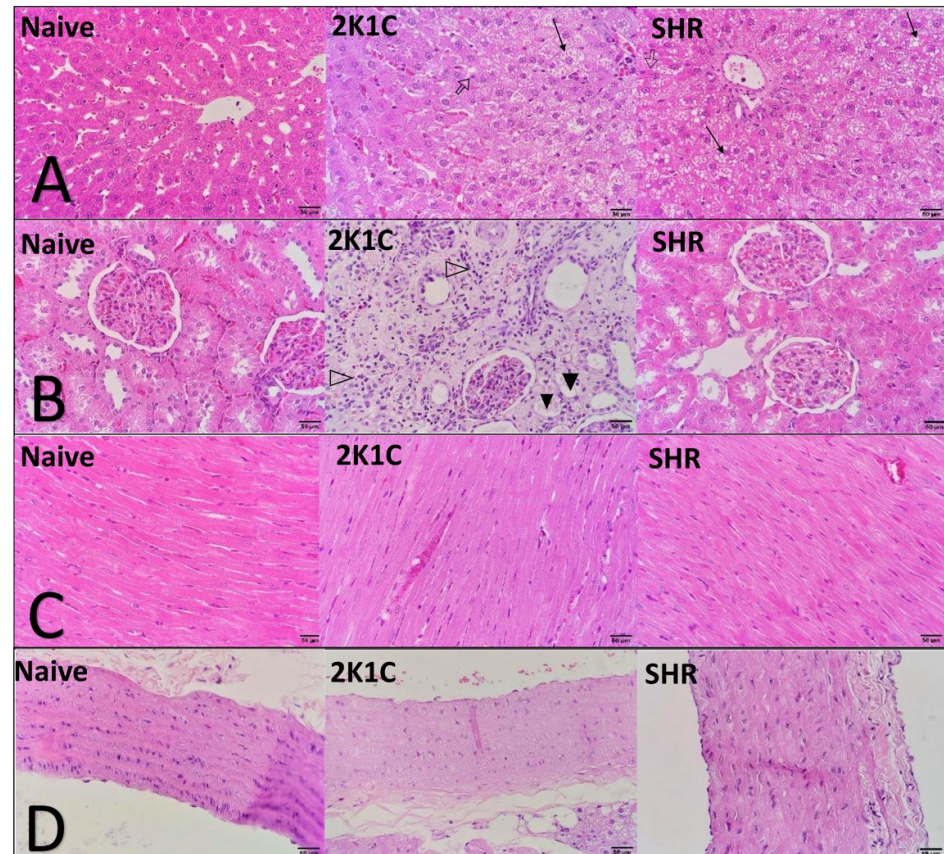
| Parameter            | Naive           | 2K1C                         | SHR                          |
|----------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| Heart (%)            | 0.23 $\pm$ 0.01 | 0.31 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 0.32 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> |
| Right kidney (%)     | 0.30 $\pm$ 0.01 | 0.31 $\pm$ 0.06              | 0.32 $\pm$ 0.02              |
| Liver (%)            | 2.78 $\pm$ 0.34 | 3.39 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 4.08 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup> |
| Right ventricle (mm) | 0.78 $\pm$ 0.15 | 0.94 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup> | 0.73 $\pm$ 0.10              |
| Left ventricle (mm)  | 1.65 $\pm$ 0.20 | 1.76 $\pm$ 0.34              | 1.52 $\pm$ 0.27              |
| IV septum (mm)       | 1.67 $\pm$ 0.35 | 2.12 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> | 2.07 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup> |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as standard error of the mean (mean  $\pm$  SEM).  $n = 8$  rats per group. <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared with naive group. 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; IV: interventricular septum; SHR: spontaneously hypertensive rat.



### 2.8. Histopathology and Morphometry

No histopathological changes were observed in the naive group. The SHR and 2K1C groups that were fed the HFD exhibited significant liver alterations, including micro- and macrovacuolization and diffuse swelling in the cytoplasm of hepatocytes. We also observed individual cell necrosis and mononuclear inflammatory infiltrate in the liver parenchyma (Figure 3). Clipped kidneys in the 2K1C group presented a focal area with the deposition of fibrous tissue, mononuclear inflammatory infiltrate, thickening of the renal capsule, and multifocal areas of calcification. The other organs did not present significant alterations (Figure 3).



**Figure 3.** Representative histological sections of the liver (A), kidney (B), heart (C), and aorta artery (D) from normotensive and hypertensive high-fat-fed rats. The black arrows show micro and macro vacuolization and diffuse swelling of the hepatocyte's cytoplasm. Empty-core arrows show necrosis in the liver. Empty-core arrowhead shows interstitial mononuclear inflammatory infiltrate. The black arrowhead shows thickening of the renal capsule in the remaining corpuscles and multifocal areas of calcification. H&E (40×). 2K1C: two-kidney-one-clip hypertension; SHR: spontaneously hypertensive rats.

Cardiac morphometry in the different experimental groups at the end of 6 weeks of the HFD is shown in Table 6. The thickness of the interventricular septum significantly increased in the SHR and 2K1C groups, compared with that in the naive group. The 2K1C group also exhibited significant thickening of the posterior wall of the right ventricle, compared with the naive group.

### 3. Discussion

Hypertension, dyslipidemia, unhealthy nutrition, and hormonal alterations are known to strongly correlate with worse cardiovascular outcomes, either in the presence or absence of CVD [10]. Although CVD is a global health problem, animal models that combine mul-



multiple cardiovascular risk factors are scarce [11]. The present study developed an effective animal model that mimics human conditions of multiple cardiovascular risk factors. We used two classic animal models of experimental hypertension that were associated with HFD and hypothyroidism. After 6 weeks, both experimental models exhibited significant dyslipidemia, oxidative stress, and renal, vascular, and cardiac impairments that are suggestive of CVD.

The main difference between the two experimental models that were used in the present study is related to the genesis of hypertension. One model involved renovascular hypertension (2K1C), and the other model used inbred rats with spontaneous hypertension (SHR). The 2K1C model was first described by Goldblatt et al. and has become a well-established animal model of hypertension [12]. This model involves partial constriction of the renal arteries, which leads to the development of renovascular hypertension [12]. By clipping the renal artery, the renin–angiotensin system is activated, inducing the upregulation of renin release in the first weeks after surgery and leading to increases in angiotensin II and hypertension. Constriction of the renal arteries closely mimics the pathophysiology of their human analog, but renovascular hypertension represents only a small fraction of manifestations of clinical hypertension [13,14]. Spontaneous hypertensive rats are the most widely used animal model of essential hypertension. This model induces cardiac and renal impairment, without a direct relationship with chronic kidney disease [15]. The SHR strain of rats originated in Kyoto, Japan, by crossing Wistar rats that exhibited spontaneous elevations of BP. Survival of the strain was possible through inbreeding over several generations [16].

The main goal of the development of animal models is to improve approaches to prevent and treat hypertension and its complications. Hypertension is a multifactorial heterogeneous disorder, with significant variability in the pharmacokinetic/pharmacodynamic drug response. Thus, understanding this pathological variability in different animal models is fundamental for accurate and reliable preclinical trials [16]. In the present study, both experimental models exhibited dyslipidemia, renal function impairment, and hepatic steatosis, accompanied by high levels of various inflammatory markers and serum oxidative stress. Consequently, these alterations contributed to end-organ damage in all hypertensive rats.

Hypertension is associated with renal damage and progressive renal disease. High BP can disturb the autoregulation of renal capillary perfusion, thereby activating the inflammatory response [17]. Alterations in urea and creatinine levels are considered important biomarkers of renal disease progression. Urine volume and renal electrolyte excretion are also closely related to renal function [18]. In the present study, both the SHR and 2K1C groups exhibited significant decreases in urinary electrolyte excretion and increases in serum urea, compared with naive rats. Interestingly, although both experimental models significantly reduced renal creatinine clearance, only the SHR group exhibited significant elevations of serum creatinine levels. Both models of hypertension promoted renal impairment, with more pronounced changes in the SHR group.

Both experimental models significantly altered lipid metabolism, causing increases in cholesterol and triglyceride levels and LDL-C oxidation. High levels of blood lipids and oxLDL particles are thresholds for atherogenesis. IL-1 $\beta$  and IL-6 are cytokines that mediate the retention of oxLDL molecules in the inner layer of arteries. The expression of sVCAM-1, sICAM, and E-selectin is then stimulated, acting as adhesion molecules on the endothelial surface [19]. This process leads to the migration of monocytes to the subendothelial space and their differentiation into macrophages. Macrophages recognize oxLDL in phagocytes, the origin of foamy cells that are characteristic of atherosclerotic lesions [20]. Although our data show that both the SRH and 2K1C groups had high serum oxLDL, cytokines, and soluble adhesion molecules, these increases were higher in SHRs, suggesting a more aggressive profile for the CVD model.

Another important difference between the two models of hypertension that were used herein refers to cardiac electrical activity. QT and QTC segments were significantly higher

in the SHR group than in the naive and 2K1C groups. QTC prolongation is related to a delay in ventricular repolarization and may lead to potentially life-threatening arrhythmia. QTC prolongation is often related to drug therapy, risk factors for which include old age, female sex, CVD, electrolyte abnormalities, thyroid disease, type 2 diabetes mellitus, and bradycardia [21]. In a study by Coan et al., male SHRs also exhibited higher QTC segments than normotensive control animals [22]. Similarly, all animals in the SHR group exhibited a significant reduction in the Phe-induced vasoconstrictor response compared with normotensive untreated rats. The vascular endothelium is responsible for producing several vasoactive substances, and dysfunctions in its physiology may affect important hemodynamic functions, aggravating CVD severity and evolution [23].

Histopathological and morphometric analyses showed significant changes that were induced in both experimental models of CVD. In the liver, the HFD and oxidative stress induced significant hepatic steatosis, accompanied by an increase in organ relative weight. The accumulation of dysfunctional ectopic fat in the liver is closely related to adverse cardiometabolic outcomes. The underlying mechanisms that link steatosis to CVD are complex and simultaneously involve several different pathways, including epigenetic, endothelial, inflammatory, atherogenic, metabolic, and gut microbiome factors. There is a current consensus that the presence of hepatic steatosis is an important indicator of poor prognosis for CVD [24]. In the present study, the changes in the heart were predictable in both hypertensive models, including an increase in relative weight and the thickening of cardiac chambers. These alterations worsen over the course of the disease and tend to be more severe with higher BP, thereby justifying the thickening of the right ventricle wall only in 2K1C rats (i.e., the group with the highest BP values) [10,25].

The present study had an important limitation. We were unable to identify the presence of atherosclerotic lesions in the arterial branches. Important biochemical alterations are strongly related to atherogenesis. The inability to identify atherosclerotic lesions is likely attributable to the natural resistance of rodents to short-term atherogenic factors [26]. We believe that maintaining this model for 8 or 12 weeks will lead to significant atherosclerotic lesions or contribute to other morphological changes that are characteristic of hypertensive disease.

In summary, the present study evaluated two new models of the rapid induction of heart disease in rats, which is associated with hypertension, hypothyroidism, and HFD. The present findings open new perspectives for preclinical studies of heart disease that is caused by multiple risk factors.

## 4. Materials and Methods

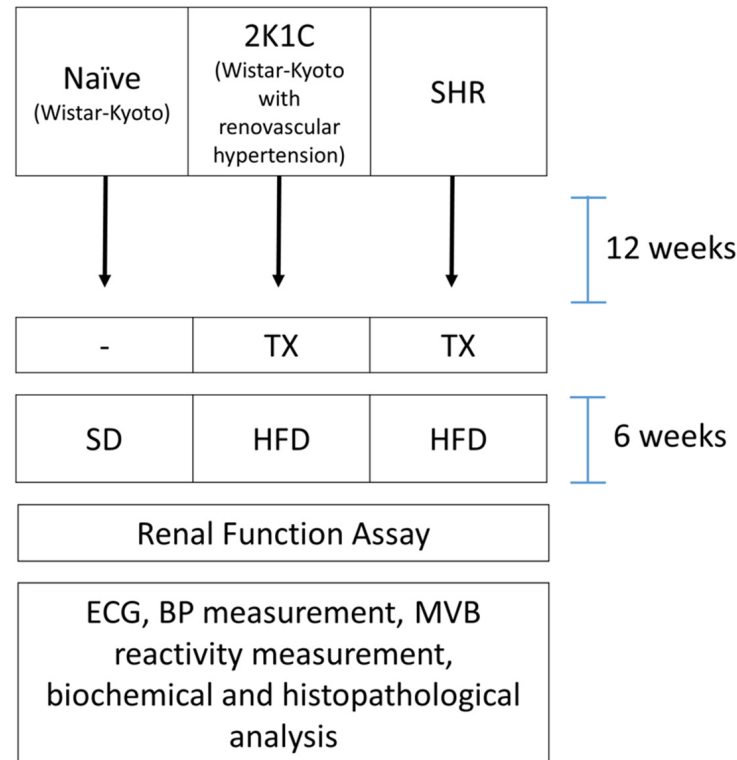
### 4.1. Drugs

The following drugs, salts, and solutions were used: ketamine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil), xylazine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil), isoflurane (BioChimico, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and heparin (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brazil). Phenylephrine, sodium nitroprusside (SNP), acetylcholine (ACh), NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dextrose, ethylenediaminetetraacetic acid, cholesterol, and colic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other reagents were obtained in analytical grade.

### 4.2. Animals and Experimental Design

For this study, 12-week-old male Wistar-Kyoto rats and SHRs were housed in environmentally enriched plastic cages at 22 °C ± 2 °C, 55% ± 10% humidity, and a light/dark cycle of 12 h/12 h. These animals have ad libitum access to food and water. All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Grande Dourados (Protocol No. 10/2020) and were performed in accordance with the Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals.

The animals were randomized and divided into three experimental groups ( $n = 8/\text{group}$ ): two groups of hypertensive rats (2K1C and SHR) and one normotensive group of naïve rats (Figure 4).



**Figure 4.** Experimental design: 2K1C: two-kidney-one-clip; HFD: high-fat diet; BP: body pressure; ECG: electrocardiography; MVB: mesenteric vascular bed; SHR: spontaneously hypertensive rats; TX: thyroidectomy.

#### 4.3. Experimental Procedures

##### 4.3.1. Induction of Renovascular Hypertension

Renovascular hypertension was induced using procedures that were previously described by Ikawa et al. [27], with some modifications. Initially, the rats were anesthetized via isoflurane inhalation (1–2%) in a saturation chamber. The left renal artery was exposed by median laparotomy and dissected from the renal vein and connective tissue. A 0.25 mm lumen silver clip was attached to the left renal artery to cause partial occlusion. The muscle layer and skin were then sutured. At the end of the surgery, all animals received postoperative care for 3 days, including hydration, a sterile dressing, analgesia (0.2% meloxicam, 5 mg/kg, subcutaneously), and antibiotic therapy (10 mg/kg enrofloxacin, subcutaneously).

##### 4.3.2. Thyroidectomy

Eighty-four days after surgery to induce renovascular hypertension, the rats in the 2K1C and SHR groups underwent thyroidectomy. Total thyroidectomy was performed according to Patel et al. (2013) [28]. The rats were anesthetized by isoflurane inhalation (1–2%) and placed in the supine position. An incision (2 cm) was made in the ventral cervical midline, ending at the level of the clavicle. The underlying salivary and lymphatic glandular tissue was laterally displaced. The omohyoid muscle was dissected to visualize the trachea, larynx, and thyroid gland. The thyroid gland was gently removed, and the incision was sutured. All animals received postoperative care for 3 days, including hydration, a sterile dressing, analgesia (0.2% meloxicam, 5 mg/kg, subcutaneously), and antibiotic therapy (10 mg/kg enrofloxacin, subcutaneously).

#### 4.3.3. High-Fat Diet

The HFD was produced according to the protocol of Guarnier et al. (2019), with the following composition: 64.4% standard diet, 0.5% cholesterol, 0.1% sodium cholate, 5% sucrose, 5% lard, 5% hydrogenated fat, and 20% powdered egg [26]. Immediately after thyroidectomy, the HFD was offered to the 2K1C and SHR groups. The naive rats were fed a standard commercial diet. The diet was offered ad libitum for 42 days.

#### 4.3.4. Renal Function Assay

On the morning of day 43, the rats were placed in metabolic cages, and urine was collected for 24 h. Urine density and pH were measured with a portable refractometer (NO107; Nova Instruments, Piracicaba, Brazil) and digital pH meter (Q400MT; Quimis Instruments, Diadema, Brazil), respectively. Urinary potassium, sodium, chloride, creatinine, and urea levels were quantified in an automated biochemical analyzer (Cobas Integra 400 plus, Roche, Basel, Switzerland).

#### 4.3.5. Electrocardiography

After urine collection, all rats were anesthetized intramuscularly with 100 mg/kg ketamine and 20 mg/kg xylazine. Four electrodes were then placed on the two forelimbs and two hindlimbs of each animal. Electrocardiography (ECG) waves were recorded for 5 min using a 12-lead ECG recorder (WinCardio, Micromed, Brasilia, Brazil) [23].

#### 4.3.6. Blood Pressure and Heart Rate Measurement

After ECG recording and while still under deep anesthesia, all animals received a subcutaneous injection of heparin (30 IU). The left carotid artery was exposed, isolated, cannulated, and connected to a pressure transducer coupled to a recording system (PowerLab) and its integration software (Chart 7.1; both from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). Systolic blood pressure, DBP, MAP, and HR were recorded for 20 min [29].

#### 4.3.7. Mesenteric Vascular Reactivity

After direct blood pressure measurements, the MVB was isolated according to McGregor (1965) [30]. The MVB was removed, coupled to the perfusion system, and continuously perfused with physiological saline solution (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 mM dextrose, and 0.03 mM ethylenediaminetetraacetic acid; aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) at a constant flow rate of 4 mL/min. Changes in perfusion pressure were recorded by a pressure transducer coupled to a recording system (PowerLab) running Chart 7.1 software (both from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). After a 30 min stabilization period, tissue integrity was assessed with a bolus injection of KCl (120 mmol). Vascular reactivity to Phe (3, 10, 30, and 100 nmol) was then evaluated. After a new 30 min stabilization period, the tissues were continuously perfused with physiological saline solution plus 3 µM Phe to induce a prolonged increase in perfusion pressure. After stabilization of the contractile process, vascular reactivity to ACh (0.3, 1, 3, and 10 nmol) and SNP (0.03, 0.1, 0.3, and 1 nmol) was evaluated.

#### 4.3.8. Blood Analyses

Immediately after MVB withdrawal, blood samples were collected from the previously cannulated left carotid artery. Serum was obtained via centrifugation at 1500× *g* for 10 min. Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase (AST), creatinine, urea, triglycerides, total cholesterol, and HDL-C levels were measured using a semi-automated biochemical analyzer (Aker BIO-200). LDL-C and VLDL-C were calculated according to the Friedwald formula [5]. Serum NT, oxLDL, sVCAM-1, sICAM-1, IL-1β, and IL-6 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Malondialdehyde levels were measured using an MDA assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

#### 4.3.9. Relative Organ Weight

At the end of the experiments, the animals were euthanized via deep anesthesia (>50–60% isoflurane) in a saturation chamber. After euthanasia, the heart, right kidney, and liver were cleaned and weighed. The relative organ weight was determined as the following:

$$\text{relative weight (RW) \%} = \text{absolute organ weight} \times 100 / \text{body weight.} \quad (1)$$

#### 4.3.10. Histopathology and Morphometry

Samples of the left ventricle, right kidney, liver, and subclavian and right carotid arteries were stored in 10% formalin. The material was cleaved, dehydrated in ethanol, diaphanized in xylol, and embedded in histological paraffin. The samples were sectioned (5 mm) and stained with hematoxylin–eosin and orcein (arteries) and examined under an optical microscope. The right and left ventricles and interventricular septum were measured using Motic Images Plus 2.0 Mac OS X (Kowloon Bay, Kowloon, Hong Kong).

#### 4.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of  $n = 8$  animals per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 5. Conclusions

The present study identified a viable alternative to induce a combination of multiple cardiovascular risk factors in an animal model that resembles conditions that are seen in humans. Both models were able to develop significant CVD, but the SHR group exhibited more significant pathophysiological changes.

**Author Contributions:** Conceptualization, funding acquisition, and project administration, A.G.J.; methodology, investigation, and data curation, K.G.T.M., A.A.M.M., G.P.d.S., B.R.L., C.S.F., P.R.T.L., A.C.d.S., R.I.C.S. and L.I.d.S.; writing—original draft preparation, K.G.T.M.; supervision and writing—review and editing, A.G.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil; no. 71/700.135/2018), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil; no. 407685/2018-9), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Grande Dourados (protocol code 10/2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Roth, G.A.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788. [[CrossRef](#)]
2. Kaptoge, S.; Pennells, L.; De Bacquer, D.; Cooney, M.T.; Kavousi, M.; Stevens, G.; Riley, L.M.; Savin, S.; Khan, T.; Altay, S.; et al. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: Revised models to estimate risk in 21 global regions. *Lancet Glob. Health* **2019**, *7*, e1332–e1345. [[CrossRef](#)]
3. Bays, H.E.; Taub, P.R.; Epstein, E.; Michos, E.D.; Ferraro, R.A.; Bailey, A.L.; Kelli, H.M.; Ferdinand, K.C.; Echols, M.R.; Weintraub, H.; et al. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. *Am. J. Prev. Cardiol.* **2021**, *5*, 100149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Agabiti Rosei, E.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D.L.; Coca, A.; de Simone, G.; Dominiczak, A.; et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 3021–3104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Oparil, S.; Acelajado, M.C.; Bakris, G.L.; Berlowitz, D.R.; Cifková, R.; Dominiczak, A.; Grassi, G.; Jordan, J.; Poulter, N.R.; Rodgers, A.; et al. Hypertension. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 18014. [[CrossRef](#)]
6. Hurtubise, J.; McLellan, K.; Durr, K.; Onasanya, O.; Nwabuko, D.; Ndisang, J.F. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2016**, *18*, 82. [[CrossRef](#)]
7. Sue, L.Y.; Leung, A.M. Levothyroxine for the Treatment of Subclinical Hypothyroidism and Cardiovascular Disease. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 591588. [[CrossRef](#)]
8. Veseli, B.E.; Perrotta, P.; De Meyer, G.R.; Roth, L.; Van der Donckt, C.; Martinet, W.; De Meyer, G.R. Animal models of atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *816*, 3–13. [[CrossRef](#)]
9. Zaragoza, C.; Gomez-Guerrero, C.; Martin-Ventura, J.L.; Blanco-Colio, L.M.; Lavin, B.; Mallavia, B.; Tarin, C.; Mas, S.; Ortiz, A.; Egido, J. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 497841. [[CrossRef](#)]
10. Virani, S.S.; Alonso, A.; Aparicio, H.J.; Benjamin, E.J.; Bittencourt, M.S.; Callaway, C.W.; Carson, A.P.; Chamberlain, A.M.; Cheng, S.; Delling, F.N.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, e254–e743. [[CrossRef](#)]
11. Zago, P.M.J.J.; da Silva, G.R.; Amaral, E.C.; Barboza, L.N.; Braga, F.D.A.; Lorençone, B.R.; Marques, A.A.M.; Moreno, K.G.T.; Leite, P.R.T.; Veiga, A.D.A.; et al. Multiple Risk Factors for Heart Disease: A Challenge to the Ethnopharmacological Use of *Croton urucurana* Baill. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 6580458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F.; Summerville, W.W. Studies on Experimental Hypertension. *J. Exp. Med.* **1934**, *59*, 347–379. [[CrossRef](#)]
13. Kim, Y.G.; Lee, S.-H.; Kim, S.-Y.; Lee, A.; Moon, J.-Y.; Jeong, K.-H.; Lee, T.W.; Lim, S.J.; Sohn, I.S.; Ihm, C.-G. Sequential activation of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of hypertensive nephropathy in Goldblatt rats. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2016**, *311*, F195–F206. [[CrossRef](#)]
14. Alawi, L.F.; Dhakal, S.; Emberesh, S.E.; Sawant, H.; Hosawi, A.; Thanekar, U.; Grobe, N.; Elased, K.M. Effects of Angiotensin II Type 1A Receptor on ACE2, Neprilysin and KIM-1 in Two Kidney One Clip (2K1C) Model of Renovascular Hypertension. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 602985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gutsol, A.A.; Blanco, P.; Hale, T.M.; Thibodeau, J.-F.; Holterman, C.E.; Nasrallah, R.; Correa, J.W.N.; Afanasiev, S.A.; Touyz, R.M.; Kennedy, C.R.J.; et al. Comparative analysis of hypertensive nephrosclerosis in animal models of hypertension and its relevance to human pathology. Glomerulopathy. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0264136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lerman, L.O.; Kurtz, T.W.; Touyz, R.M.; Ellison, D.H.; Chade, A.R.; Crowley, S.D.; Mattson, D.L.; Mullins, J.J.; Osborn, J.; Eirin, A.; et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* **2019**, *73*, e87–e120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Braun, M.C.; Herring, S.M.; Gokul, N.; Monita, M.; Bell, R.; Zhu, Y.; Gonzalez-Garay, M.L.; Wenderfer, S.E.; Doris, P.A. Hypertensive Renal Injury Is Associated With Gene Variation Affecting Immune Signaling. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2014**, *7*, 903–910. [[CrossRef](#)]
18. Wirz, H.; Geigy, J.R. Kidney, Water and Electrolyte Metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **1961**, *23*, 577–606. [[CrossRef](#)]
19. Weber, C.; Noels, H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1410–1422. [[CrossRef](#)]
20. Sakakura, K.; Nakano, M.; Otsuka, F.; Ladich, E.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Hear. Lung Circ.* **2013**, *22*, 399–411. [[CrossRef](#)]
21. Farzanegan, B.; Hosseinpour, Z.; Baniasadi, S.; Seyyedi, S.R.; Rajabi, M. An Observational Study of QTc Prolongation in Critically Ill Patients: Identification of Incidence and Predictors. *Indian J. Crit. Care Med.* **2020**, *24*, 270–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Coan, P.M.; Hummel, O.; Diaz, A.I.G.; Barrier, M.; Alfazema, N.; Norsworthy, P.; Pravenec, M.; Petretto, E.; Huebner, N.; Aitman, T.J. Genetic, physiological and comparative genomic studies of hypertension and insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Dis. Model. Mech.* **2017**, *10*, 297–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Romão, P.V.M.; Palozi, R.A.C.; Guarnier, L.P.; Silva, A.O.; Lorençone, B.R.; Nocchi, S.R.; Moura, C.C.D.F.S.; Lourenço, E.L.B.; Silva, D.B.; Junior, A.G. Cardioprotective effects of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *242*, 112042. [[CrossRef](#)]
24. Kasper, P.; Martin, A.; Lang, S.; Kütting, F.; Goesser, T.; Demir, M.; Steffen, H.-M. NAFLD and cardiovascular diseases: A clinical review. *Clin. Res. Cardiol.* **2020**, *110*, 921–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tong, R.-C.; Qi, M.; Yang, Q.-M.; Li, P.-F.; Wang, D.-D.; Lan, J.-P.; Wang, Z.-T.; Yang, L. Extract of *Plantago asiatica* L. Seeds Ameliorates Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats by Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 403. [[CrossRef](#)]
26. Guarnier, L.P.; Romão, P.V.M.; Palozi, R.A.C.; Silva, A.O.; Lorençone, B.R.; Marques, A.A.M.; dos Santos, A.C.; Souza, R.I.C.; Souza, K.D.; Lourenço, E.L.B.; et al. Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats. *Biomolecules* **2019**, *9*, 664. [[CrossRef](#)]

27. Ikawa, T.; Watanabe, Y.; Okuzaki, D.; Goto, N.; Okamura, N.; Yamanishi, K.; Higashino, T.; Yamanishi, H.; Okamura, H.; Higashino, H. A new approach to identifying hypertension-associated genes in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **2019**, *37*, 1644–1656. [[CrossRef](#)]
28. Patel, M.; Mishra, V.; Pawar, V.; Ranvir, R.; Sundar, R.; Dabhi, R. Evaluation of acute physiological and molecular alterations in surgically developed hypothyroid Wistar rats. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2013**, *4*, 110–115. [[CrossRef](#)]
29. Junior, A.G.; Gasparotto, F.M.; Lourenço, E.L.B.; Crestani, S.; Stefanello, M.E.A.; Salvador, M.J.; da Silva-Santos, J.E.; Marques, M.C.A.; Kassuya, C.A.L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 363–372. [[CrossRef](#)]
30. McGregor, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* **1965**, *177*, 21–30. [[CrossRef](#)]

**Artigo 2: Revista Planta Medica (FI 2.7)**

<https://www.thieme.de/de/planta-medica/140866.htm>





**Effects of essential oil of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke on a multiple cardiovascular risk factors model in rats**

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Journal:                      | <i>Planta Medica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Manuscript ID                 | Draft                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Manuscript Type:              | Original Papers                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Date Submitted by the Author: | n/a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Complete List of Authors:     | Moreno, Karyne Garcia ; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>Marques, Aline Aparecida ; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>da Silva, Gabriela ; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>Bertoncelo, Luana; Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências da Saúde/UFGD<br>Pessoal, Luciane; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>Gonçalves, Larissa; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>dos Santos, Ariany ; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences<br>Souza, Roosevelt ; Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências da Saúde/UFGD<br>Silva, Denise; FCFRP-USP, Chemistry and Physics; Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produtos Naturais LTDA,<br>Gasparotto Junior, Arquimedes; Federal University of Grande Dourados, Department of Health Sciences |
| Keywords:                     | Verbenacea, ka'á jaguá, traditional medicine, dyslipidemias, antihypertensive, antioxidant                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Dourados, September 25<sup>th</sup> 2023

To  
Oliver Kayser  
Editor-in-Chief  
Planta Medica

Dear Dr Oliver Kayser,

I have attached the mandatory submission form for the manuscript ***“Effects of essential oil of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke on a multiple cardiovascular risk factors model in rats”*** by Moreno et al.

*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke is a species popularly used to treat several pathologic conditions, with some cardioprotective effects already identified. This study aimed to investigate the protective effects of the essential oil of *A. polystachya* (EOAP) leaves in a model of multiple cardiovascular risk factors. We investigated the acute toxicity of EOAP and cardioprotective effects at different doses during 42 days of treatment in a model that associates thyroidectomy and a high-fat diet in SHR animals. The renal function, electrocardiography, blood pressure, vascular reactivity, serum biochemical profile, organ histology, and morphometry were evaluated at the end of the treatment. The EOAP was also analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The main identified compounds in GC-MS were  $\beta$ -myrcene, limonene, and carvone. The data suggest the absence of acute toxicity of EOAP. The EOAP reverted decreased urinary excretion of sodium, chloride, and creatinine, attenuated QTC interval prolongation and reduced pressure levels. Moreover, the treatment prevented increased inflammatory and serum oxidative stress markers.

The referred manuscript has not been published or is under active consideration by another journal. I also inform you that the manuscript has been fully revised to avoid overlap with other published papers.

Sincerely yours,



Prof. Arquimedes Gasparotto Junior, PharmD, PhD

**Effects of essential oil of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke on a multiple cardiovascular risk factors model in rats**

**Karyne Garcia Tafarelo Moreno<sup>1</sup>, Aline Aparecida Macedo Marques<sup>1</sup>, Gabriela Pereira da Silva<sup>1</sup>, Luana Ale Bertoncello<sup>1</sup>, Luciane Barbosa Pessoa<sup>1</sup>, Larissa Dantas Gonçalves<sup>1</sup>, Ariany Carvalho dos Santos<sup>2</sup>, Roosevelt Isaías Carvalho Souza<sup>2</sup>, Denise Brentan da Silva<sup>3</sup>, and Arquimedes Gasparotto Junior<sup>1</sup>**

**Affiliation**

<sup>1</sup> Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFAC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Histopathology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

**Correspondence**

***Prof. Arquimedes Gasparotto Junior***

Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFAC)

Faculty of Health Sciences

Federal University of Grande Dourados

Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O.

Box 533, 79.804-970 Dourados, MS

Brazil

Phone: +55 (67) 3410-2333

Fax: +55 (67) 3410-2321

arquimedesjunior@ufgd.edu.br

## Abstract

Traditional medicine is a common source of treatment for cardiovascular disease and its major risk factors, such as hypertension and dyslipidemia. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke is a species popularly used to treat several pathologic conditions, with some cardioprotective effects already identified. This study aimed to investigate the protective effects of the essential oil of *A. polystachya* (EOAP) leaves in a model of multiple cardiovascular risk factors. We investigated the acute toxicity of EOAP and its cardioprotective effects at different doses (1.47 mg/kg; 4.40 and 13.20 mg/kg) during 42 days of treatment in a model that associates thyroidectomy and high-fat diet in SHR animals, using rosuvastatin (5 mg/kg) as control. The renal function, electrocardiography, blood pressure, vascular reactivity, serum biochemical profile, organ histology, and morphometry were evaluated at the end of the treatment. The EOAP was also analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The main identified compounds in GC-MS were  $\beta$ -myrcene (1.08%), limonene (40.13%), and carvone (56.47%). The data suggest the absence of acute toxicity of EOAP. The EOAP reverted decreased urinary excretion of sodium, chloride, and creatinine, attenuated QTC interval prolongation and reduced pressure levels. Moreover, the treatment prevented increased inflammatory and serum oxidative stress markers. We evidenced significant cardioprotective effects of EOAP against multiple cardiovascular risk factors in hypertensive rats.

**Keywords:** Verbenaceae, ka'á jaguá, traditional medicine, dyslipidemias, antihypertensive, antioxidant

## Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide. With an estimated death toll of 17.8 million, CVD remains a crucial contributing factor to rising healthcare costs and premature mortality [1]. It is known that several risk factors lead to an increase in the occurrence and aggravation of CVD; these include unhealthy nutrition, sedentary lifestyle, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension, obesity, endocrine or kidney diseases, smoking, gender, as well as ethnicity [2]. A healthcare approach that previously identified or prevents risk factors ensures effective clinical patient management before the most relevant cardiovascular complications [3].

Traditional medicine is a common source of treatment for chronic and acute conditions, including CVDs. Medicinal plants are already used by 80% of the world's population in primary health care and are emerging as promising agents for managing CVDs and associated risk factors [4,5]. However, due to the vast natural biodiversity, science is still far from an exhaustive and detailed investigation for clinical and safe use [5].

*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (synonym *Lippia polystachya* Griseb.) is a native species from South Bolivia to North Argentina. Popularly known as ka'á jaguá, burrito, té-burro, poleo-riojano, poleo-de-castilla, aloisia, or erva-serrana (mountain grass) [6], its use is closely linked to the South American culture and folk medicine to treat anxiety, hypertension, respiratory, and gastrointestinal disorders [7–9]. This species is commonly used for its aromatic property by giving a minty flavour to traditional Brazilian drinks for daily consumption (e.g., "mate" and "tererê" mixed with *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Rich in antioxidant compounds, this species presents a main phytochemical composition of terpenes, flavonoids, and phenolic compounds [10,11], with a considerable relative percentage of monoterpenes and sesquiterpenes, including carvone, limonene, and  $\alpha$ -thujone. Its

carminative and dyspeptic activities have been attributed to carvone and limonene, the major compounds present in the essential oil [6].

Some biological activities of *A. polystachya* have already been investigated, such as antioxidant [9,12], antibacterial, antiproliferative [13,14], sedative, and anxiolytic [8,15,16], besides cardioprotective effects against hypertension and myocardial infarct [11,17]. Despite these elucidations, the impact of *A. polystachya* on the treatment and prevention of CVD and its risk factors still have great potential to be explored. Thus, this study aims to investigate the protective effects of the essential oil of *A. polystachya* (EOAP) in a model of multiple cardiovascular risk factors.

## Results and Discussion

The yield from EOAP was 2.7%. The main compounds identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were  $\beta$ -myrcene (1.08%), limonene (40.13%), and carvone (56.47%) (Table1). These last two were observed with higher relative percentages as highlighted by previous studies [9,14]. Many factors, including location, climate, and extraction method, can influence its production by plants. The monoterpene carvone is conjugated with a ketone group, resulting in a more remarkable ability to capture free radicals [9]. Moreover, limonene is a monocyclic monoterpene that can inhibit lipid peroxidation and the production of free radicals, preventing endothelial dysfunction and reducing blood pressure levels [9,18].

Throughout the 14-day observation period, no deaths or changes in general behaviour were observed in female Wistar rats. Therefore, the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) of the EOAP was stipulated as higher than 2,000 mg/kg. No significant differences were found between the control group and EOAP-treated rats regarding their final weight, weight gain, relative and

absolute weight of isolated organs, water, and food consumption. Furthermore, no histopathological changes were evidenced in all tissues studied.

This study employed a model of multiple cardiovascular risk factors to investigate the cardioprotective effects of EOAP in rats using rosuvastatin as control. Previously validated, this model associate's dyslipidemia, hypothyroidism, and hypertension, inducing oxidative stress and cardiorenal impairments [19]. It is already well-established that several risk factors, including dyslipidemia, hypertension, and hormonal modifications, are strongly related to higher cardiovascular risk outcomes [20]. Vascular endothelium can be significantly damaged by hypertension and dyslipidemia, impairing vasomotor performance, and accelerating the progression of atherosclerotic disease [21]. Besides the genetic profile, unhealthy nutrition can also aggravate dyslipidemia and hypertension; diets rich in saturated fat, cholesterol, salt, sugar, and alcohol are among the most significant contributors [3]. Furthermore, changes in thyroid hormones can also affect body weight, nutrient metabolism, nitric oxide production, vascular tone, and cardiac gene expression, directly influencing lipids and blood pressure levels [22].

Among several other indications, the infusion of *A. polystachya* leaves is also popularly used to treat cardiovascular system diseases [7]. The ethanol-soluble fraction originating from *A. polystachya* infusion was previously used to investigate the cardioprotective effects in Spontaneous Hypertensive Rats (SHRs). The results showed that the prolonged treatment prevents cardiorenal changes in hypertensive rats [11]; in another study, the same fraction significantly improved the cardiac function in infarcted rats [17].

Urinary parameters obtained in this study are presented in Table 2. The urinary volume, pH, and density did not show statistically significant differences between all experimental groups. On the other hand, the renal excretion of sodium, chloride and creatinine was significantly reduced in the negative control group (NC) and EOAP at the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

lowest dose (1.47 mg/kg). Treatment with EOAP at its highest doses (4.40 and 13.20 mg/kg) or with rosuvastatin was able to revert these changes, maintaining renal excretion of electrolytes and creatinine similar to that observed in the naïve group.

Regarding electrocardiographic data (Table 3), the NC and rosuvastatin groups presented a prolonged QTC segment compared to the naïve rats. Treatment with EOAP (at all doses) reversed these alterations, maintaining QTC segment values close to those observed in naïve rats.

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) values were significantly higher in the NC group than in the naïve rats (Table 4). The SBP values in the rosuvastatin and EOAP-treated groups did not differ significantly from the naïve animals. For DBP, treatment with EOAP or rosuvastatin significantly reduced the pressure levels compared to rats from the NC group. However, the values were still statistically higher than naïve animals. The heart rate decreased in the NC and all EOAP-treated rats compared to the naïve group.

The multiple cardiovascular risk factors model promoted reduced urinary electrolyte excretion, a prolonged QTC segment, and increased SBP, DPB, and heart rate (HR) levels in NC rats. Furthermore, creatinine, lipids, inflammatory and oxidative markers levels were elevated. The treatment with EOAP, for 42 days, prevented the renal, electrocardiographic, and hemodynamic changes, maintaining SBP levels similar to those found in naïve animals.

The effects of rosuvastatin and EOAP on the biochemical parameters of male rats with multiple cardiovascular risk factors are presented in Table 5. Animals in the NC group show a significant increase in creatinine and serum lipids, besides in levels of the different inflammatory and serum oxidative stress markers. Only rosuvastatin significantly reduced triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL-C), very low-density lipoprotein (VLDL-C), high-density lipoprotein (HDL-C) and total cholesterol (TC) levels. In contrast, the



1  
2  
3 treatment with EOAP significantly reduced the serum oxidative stress markers' levels,  
4 including nitrotyrosine (NT), oxidized LDL (oxLDL), and malondialdehyde (MDA). All  
5  
6 treatments significantly reduced creatinine, circulating vascular cell adhesion molecule-1  
7  
8 (sVCAM-1), circulating intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interleukin (IL)-1  $\beta$ ,  
9  
10 and IL-6 levels compared to the NC group rats. However, they remained statistically different  
11  
12 from the animals in the naïve group.  
13  
14  
15

16  
17 Although EOAP could not reduce serum lipid levels (as the rosuvastatin), the herbal  
18  
19 preparation was more efficient than rosuvastatin in reducing oxidative stress markers such as  
20  
21 oxLDL, NT, and MDA. The OxLDL molecules are determinants for endothelial dysfunction  
22  
23 and atherogenesis. Due to its accumulation, endothelial cells release cytokines IL-1  $\beta$  and IL-  
24  
25 6, stimulating the expression and release of adhesion molecules, including sVCAM-1,  
26  
27 sICAM-1, and E-selectin [23]. Although rats naturally resist short-term atherogenic factors  
28  
29 [24], the EOAP treatment prevented these molecular alterations related to atherogenesis.  
30  
31  
32

33 The NC group showed lower vasodilator responses to 300 nmol of acetylcholine  
34  
35 (ACh) than the naïve group. Prolonged treatment with different doses of EOAP or  
36  
37 rosuvastatin prevented this change, maintaining mesenteric vascular reactivity similar to that  
38  
39 in naïve animals. (Table 6).  
40  
41

42 The data from relative organ weight and cardiac morphometry are presented in Table  
43  
44 7. The relative heart and liver weights in the NC, EOAP-treated and the animals receiving  
45  
46 rosuvastatin were statistically higher than in naïve rats. None of the treatments performed was  
47  
48 able to prevent or reverse this change. The histological findings are shown in Figure 1.  
49  
50 Widespread microvacuolizations were detected in the cytoplasm of hepatocytes from all  
51  
52 groups treated with HFD. There were no significant findings in samples from other organs.  
53  
54  
55

56 It is worth mentioning that the relative weight of the heart increases stems from  
57  
58 structural alterations arising from hypertension and dyslipidemia. Its reversal depends on  
59  
60

1  
2  
3 long-term pharmacological treatment associated with changes in dietary conditions [21]. In  
4  
5 addition, the liver's relative weight increases come from excess nutritional lipids, which  
6  
7 impose vacuolation of the hepatocyte's cytoplasm [19]. Despite the EOAP being unable to  
8  
9 revert these alterations, we believe a chronic treatment associated with dietary changes could  
10  
11 bring additional benefits to the model, which is a limitation of the current study.  
12  
13

14  
15 The data presented here did not provide substantial information to define a dose-  
16  
17 dependent effect, which is relatively common among medicinal plants due to its large sets of  
18  
19 metabolites that may contribute to alterations in the synergistic and antagonistic effects [25].  
20  
21 Despite the limitation of our methods in fully identifying the mechanism by which EOAP  
22  
23 acted to attenuate the biochemical, hemodynamic, and electrocardiographic alterations  
24  
25 imposed by the cardiovascular risk factors, our results show the significant potential to be  
26  
27 explored concerning the cardioprotective effects of the EOAP, which is already widely  
28  
29 consumed and used by the local population.  
30  
31

32  
33 The data allow us to conclude that essential oil obtained from *Aloysia polystachya*  
34  
35 leaves has a significant cardioprotective effect against cardiovascular risk factors. This study  
36  
37 shows that EOAP is a prototype for developing a new herbal medicine that can be used as an  
38  
39 add-on in treating different cardiovascular diseases.  
40  
41

## 42 43 44 45 **Material and Methods**

### 46 47 48 49 *Drugs*

50  
51  
52 The drugs, salts, and solutions employed were heparin (Hipolabor, Belo Horizonte,  
53  
54 MG, Brazil), isoflurane (BioChimico, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), ketamine hydrochloride  
55  
56 and xylazine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil). Phenylephrine (Phe), sodium  
57  
58 nitroprusside (SNP), ACh, Tween 80, rosuvastatin, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>,  
59  
60

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ethylenediaminetetraacetic acid, dextrose, colic acid, and cholesterol, were purchased from Sigma-Aldrich. All the other reagents were obtained in analytical grade.

#### *Plant collection and identification*

*Aloysia polystachya* leaves were collected in March 2022 directly from the natural habitat situated in the Grande Dourados region of Mato Grosso do Sul state, Brazil's Midwest, at an elevation of 430 meters above sea level (21°13'15" S 54°48'21" O). A voucher specimen numbered 892 was authenticated by Dr. Zefa Valdivina Pereira and deposited in the Herbarium DDMS of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). The plant's nomenclature follows the online database published by "The Plant List" (accessed on March 23, 2023).

#### *Extraction of essential oil*

The leaves of *A. polystachya* were dried in an oven set at a temperature of 45 °C (113 °F) for five days. Subsequently, the resultant dried leaves were finely ground into a powder. The essential oil of *A. polystachya* (EOAP) was extracted by hydrodistillation for 2 hours, under 40°C through hydrodistillation, using a Clevenger-type apparatus. The EOAP obtained was stored in glass vials and kept under  $-4 \pm 0.5$  °C without light until further analysis [26,27]. The yield of EOAP was performed in triplicate and calculated in volume/mass %. An aqueous emulsion of the essential oil was prepared with Tween 80 for administration.

#### *Chemical Analysis by GC-MS*

The chemical analysis from EOAP was performed in a gas chromatography Shimadzu QP2010 GC-MS with an electron ionization (EI) source (70 eV). A chromatographic column Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 mm of thickness) was applied in the analysis. The split ratio

was 1:20, and helium was the carrier gas (column flow rate 1.30 mL/min and pressure 79.7 kPa). The temperature program profile was 60 to 220°C, increasing by 3°C/min. The mass spectra were compared to data in WILEY 7, NIST 11, and FFNSC data banks. A series of alkanes C8 to C25 was injected and used to calculate the retention index, which was compared with the data in Adams (1995) [28].

### *Animals*

12-week-old female Wistar rats, male Wistar-Kyoto rats, and SHR were housed in environmentally enriched plastic cages at a temperature of 22°C ± 2°C, relative humidity of 55% ± 10%, and a 12-hour light/dark cycle. The animals were provided with unlimited access to food and water. All procedures were conducted in strict accordance with the Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals and were approved by the Institutional Committee of the Federal University of Grande Dourados under Protocol N°. 10/2020.

### *Safety evaluation*

The acute toxicity assay was conducted according to the methodology outlined in Marques et al. (2021) [11]. Ten female rats were divided equally into two experimental groups. Before treatment, rats were acclimatized, and one animal from each group was subjected to an overnight fast. The rats were weighed, and the dose of EOAP or vehicle (filtered water; 0.2 mL/100 g) was administered orally to one animal, followed by withholding food for an additional two hours. If no toxicity or lethality was observed in treated animals within the initial 24-hour period, the remaining animals were also treated fasting and monitored for 14 days. During this period, body weight gain, food and water intake, mortality rates, and any clinical signs of toxicity were observed. On the 15th day, the animals were euthanized through anaesthesia with isoflurane, followed by exsanguination. At

necropsy, the liver, spleen, heart, lung, kidneys, ovaries, and uterus were removed and weighed, and relative organ weight was calculated. Organ samples were submitted for histopathological analysis.

### *Efficacy assays*

The experimental design for inducing multiple cardiovascular risk factors was developed by Moreno et al. (2022) [19]. Animals were randomized and divided into six experimental groups (n = 8/group): 1) naïve (Wistar-Kyoto rats; feed with standard feed); 2) Negative control (NC; SHR treated with filtered water 0.2 mL/100 g and feed with high-fat diet (HFD)); 3) EOAP 1 (SHR treated with EOAP 1.47 mg/kg and feed with HFD); 4) EOAP 2 (SHR treated with EOAP 4.40 mg/kg and feed with HFD); 5) EOAP 3 (SHR treated with EOAP 13.20 mg/kg and feed with HFD); 6) ROSU (SHR treated with rosuvastatin 5 mg/kg and feed with HFD). Animals were treated orally, once a day, for 42 days. The doses were determined based on ethnobotanical information on the regional use of the plant. The reported daily use corresponds to the amount of dry plant equivalent to a "closed hand". Thus, the amounts equal to 20 "closed hands" were weighed, and the average was calculated [7]. The essential oil was extracted in triplicate from a sample corresponding to the value in grams obtained. The average amount of oil obtained from these extractions was determined as an intermediate dose for a 70 kg human. The corresponding dose for rodents was calculated using the allometric extrapolation on the body area scale [29]. We also used an amount three times smaller and another three times higher than the average calculated dose.

### *Thyroidectomy*

Following randomization, thyroidectomy was performed on rats in the NC, EOAP 1, EOAP 2, EOAP 3, and ROSU groups, following the procedure described by Patel et al.

(2013) [30]. The rats were anaesthetized with isoflurane inhalation (1-2%). A 2 cm incision was made in the ventral cervical midline, extending to the clavicle's level. The underlying salivary and lymphatic glandular tissue was laterally displaced, and the omohyoid muscle was dissected to access the thyroid gland, which was delicately removed, and the incision sutured. Postoperative care was provided for three days, including a sterile dressing, analgesia (0.2% meloxicam, 5 mg/kg, subcutaneously), antibiotic therapy (10 mg/kg enrofloxacin, subcutaneously), and hydration.

### *High-fat diet*

The HFD was prepared using the Guarnier et al. (2019) protocol and consisted of 0.1% sodium cholate, 0.5% cholesterol, 5% lard, 5% hydrogenated fat, 5% sucrose, 20% powdered egg and 64.4% standard diet [31]. The HFD was offered to NC, EOAP 1, EOAP, EOAP 3, and ROSU groups three days after thyroidectomy and maintained by 42 days. Meanwhile, the naïve group was fed with a standard commercial diet.

### *Renal function assay*

On the 43<sup>rd</sup> day, the rats were placed into metabolic cages to collect their urine over 24 hours. The urine's density and pH levels were measured using a portable refractometer (Nova Instruments, Piracicaba, Brazil) and a digital pH meter (Quimis Instruments, Diadema, Brazil). The urinary levels of potassium, sodium, chloride, creatinine, and urea were quantified through an automated biochemical analyzer (Cobas Integra 400 plus, Roche).

### *Electrocardiography*

Following urine collection, all rats were anaesthetized with isoflurane inhalation (1-2%). Four electrodes were then placed on each animal's forelimbs and hindlimbs.

Electrocardiography (ECG) waves were recorded using a 12-lead ECG recorder (WinCardio, Micromed, Brasilia, Brazil) for 5 min [32].

#### *Blood pressure and heart rate measurement*

After ECG recording and under deep anaesthesia, each animal was administered a subcutaneous heparin injection (30 IU). The left carotid artery was surgically exposed, isolated, cannulated, and connected to a pressure transducer linked to a recording system (PowerLab) and its corresponding integration software (Chart 7.1; both from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). HR, mean arterial pressure (MAP), SBP and DBP were recorded for 20 min [33]

#### *Mesenteric vascular reactivity*

After hemodynamic parameters measurements, the McGregor (1965) method was used to isolate the mesenteric vascular bed (MVB) [34]. The MVB was removed and connected to the perfusion system. Continuous perfusion was maintained at a flow rate of 4 mL/min using a physiological saline solution containing 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 mM dextrose, and 0.03 mM ethylenediaminetetraacetic acid. The solution was aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Perfusion pressure changes were measured using a pressure transducer and recording system (PowerLab) with Chart 7.1 software (both from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). After 30 minutes of stabilization, KCl (120 mmol) was injected to assess tissue integrity. Vascular reactivity to Phe (30, 100, and 300 nmol) was then tested. A new 30-minute stabilization period was required while the tissues were continuously perfused with physiological saline solution plus 3  $\mu$ M Phe to induce a prolonged increase in perfusion

pressure. After the contractile process stabilized, vascular reactivity to ACh (30, 100, and 300 nmol) and SNP (3, 10, and 30 nmol) was evaluated.

### *Blood analyses*

Blood samples were collected from the left carotid artery following MVB withdrawal. Serum was obtained by centrifugation at 1,500 ×g for 10 min. Urea, creatinine, TG, LDL-C, VLDL-C, HDL-C, TC, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured using an automated Roche cobas ® 6000 biochemical analyzer. Serum NT, oxLDL, sVCAM-1, sICAM-1, IL-1 β, and IL-6 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The MDA assay kit determined MDA levels (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

### *Relative organ weight*

Upon completing the experimental procedures, the animals underwent euthanasia by deep anaesthesia, where the concentration of isoflurane exceeded 50-60% within a saturation chamber. The right kidney, liver and heart were cleaned and weighed. The relative organ weight was evaluated through the formula: relative weight (RW) % = absolute organ weight x 100 / body weight.

### *Histopathology and morphometry*

Tissue samples of the left ventricle, right kidney, liver, subclavian aorta, and right carotid arteries were preserved in 10% formalin, then subjected to cleavage, dehydration in ethanol, diaphanization in xylol, and embedding in histological paraffin. The samples were cut into 5mm sections, stained with hematoxylin-eosin and orcein (arteries), and examined



under an optical microscope. The Motic Images Plus 2.0 software measured the right and left ventricles and interventricular septum.

### *Statistical analyses*

The data was analyzed using either one or two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test. The mean and standard deviation (SD) were calculated from the data of eight animals per group. The results were deemed statistically significant if the p-value was less than 0.05.

### **Acknowledgments**

We thank Dr Zefa Valdivina Pereira and Lislaine Klider for assisting in plant identification and essential oil extraction, respectively.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **References**

- 1 Roth GA, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1736–1788. doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7
- 2 Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2019; 74: e177–e232. doi:10.1016/j.jacc.2019.03.010

- 3 Bays HE, Taub PR, Epstein E, et al. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. *Am J Prev Cardiol* 2021; 5: 100149. doi:10.1016/j.ajpc.2021.100149
- 4Alves-Silva JM, Zuzarte M, Girão H, et al. Natural Products in Cardiovascular Diseases: The Potential of Plants from the Alliioideae Subfamily (Ex-Alliaceae Family) and Their Sulphur-Containing Compounds. *Plants (Basel)* 2022; 11: 1920. doi:10.3390/plants11151920
- 5 Shaito A, Thuan DTB, Phu HT, et al. Herbal Medicine for Cardiovascular Diseases: Efficacy, Mechanisms, and Safety. *Front in Pharmacol* 2020; 11
- 6Mohammadhosseini M, Frezza C, Venditti A, et al. An overview of the genus *Aloysia Paláu* (Verbenaceae): Essential oil composition, ethnobotany and biological activities. *Nat Prod Res* 2021; 0: 1–17. doi:10.1080/14786419.2021.1907576
- 7 Coelho FC, Tirloni CAS, Marques AAM, et al. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *J Relig Health* 2019; 58: 572–588. doi:10.1007/s10943-018-0713-0
- 8 Hellióñ-Ibarrola MC, Ibarrola DA, Montalbetti Y, et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *Phytomed* 2008; 15: 478–483. doi:10.1016/j.phymed.2007.11.018
- 9 Moller AC, Parra C, Said B, et al. Antioxidant and Anti-Proliferative Activity of Essential Oil and Main Components from Leaves of *Aloysia polystachya* Harvested in Central Chile. *Molecules* 2020; 26: 131. doi:10.3390/molecules26010131
- 10 Marchetti L, Pellati F, Graziosi R, et al. Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2019; 166: 364–370. doi:10.1016/j.jpba.2019.01.033
- 11 Marques AAM, Lorençone BR, Romão PVM, et al. Ethnopharmacological investigation of the cardiovascular effects of the ethanol-soluble fraction of *Aloysia polystachya* (Griseb.)

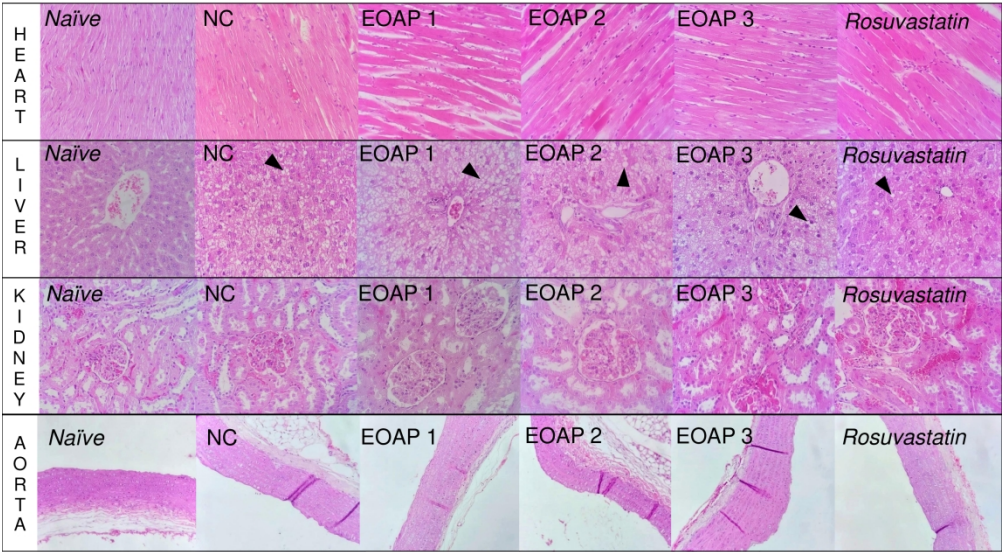
- Moldenke leaves in spontaneously hypertensive rats. J Ethnopharmacol 2021; 274: 114077.  
doi:10.1016/j.jep.2021.114077
- 12 Aguado MI, Nuñez MB, Bela AJ, et al. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). Rev Mex Cienc Farm 2013; 44: 46–51
- 13 Aguado MI, Dudik NH, Zamora CMP, et al. Antioxidant and antibacterial activities of hydroalcoholic extracts from *Aloysia polystachya* Griseb Moldenke and *Lippia turbinata* Griseb (verbenaceae). Int J Pharm Pharm Sci 2016; 393–395
- 14 Pérez-Zamora C, Torres C, Aguado M, et al. Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae) r. Lat Ame and Caribb Bull Med and Arom Plants 2016; 15: 199–215
- 15 Carmona F, Coneglian FS, Batista PA, et al. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. J Ethnoph 2019; 242: 112060.  
doi:10.1016/j.jep.2019.112060
- 16 Mora S, Díaz-Véliz G, Millán R, et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. Pharmacol Biochem Behav 2005; 82: 373–378. doi:10.1016/j.pbb.2005.09.007
- 17 Moreno KGT, de Almeida TL, Marques AAM, et al. Evidence of the Cardioprotective Effects of *Aloysia polystachya* in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. J Med Food 2023; 26: 36–39. doi:10.1089/jmf.2022.0027
- 18 Jing L, Zhang Y, Fan S, et al. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. Eur J Pharmacol 2013; 715: 46–55. doi:10.1016/j.ejphar.2013.06.022

- 19 Moreno KGT, Marques AAM, da Silva GP, et al. A New Approach for the Development of Multiple Cardiovascular Risk Factors in Two Rat Models of Hypertension. *Pharma (Basel)* 2022; 15: 853. doi:10.3390/ph15070853
- 20 Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. *Circulation* 2021; 143: e254–e743. doi:10.1161/CIR.0000000000000950
- 21 Hurtubise J, McLellan K, Durr K, et al. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18: 82. doi:10.1007/s11883-016-0632-z
- 22 Sue LY, Leung AM. Levothyroxine for the Treatment of Subclinical Hypothyroidism and Cardiovascular Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 591588. doi:10.3389/fendo.2020.591588
- 23 Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17: 1410–1422. doi:10.1038/nm.2538
- 24 Livero FADR, Gasparotto Junior A. Non-genetic rats models for atherosclerosis research: from past to present. *Front Biosci (Schol Ed)* 2019; 11: 203–213. doi:10.2741/S535
- 25 Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep* 2019; 36: 869–888. doi:10.1039/C9NP00011A
- 26 Budel JM, Wang M, Raman V, et al. Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities. *Molecules* 2018; 23: 2620. doi:10.3390/molecules23102620
- 27 Justus B, Almeida VP de, Gonçalves MM, et al. Chemical Composition and Biological Activities of The Essential Oil And Anatomical Markers Of *Lavandula Dentata* L. Cultivated In Brazil. *Braz arch biol technol* 2018; 61: e18180111. doi:10.1590/1678-4324-2018180111
- 28 Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allure Publishing Corporation, Illinois, 1995

- 29 Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and  
human. J Basic Clin Pharm 2016; 7: 27–31. doi:10.4103/0976-0105.177703
- 30 Patel M, Mishra V, Pawar V, et al. Evaluation of acute physiological and molecular  
alterations in surgically developed hypothyroid Wistar rats. J Pharmacol Pharmacother 2013;  
4: 110–115. doi:10.4103/0976-500X.110891
- 31 Guarnier LP, Romão PVM, Palozi RAC, et al. Development of a Predictive Model to  
Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats. Biomolecules 2019; 9:  
664. doi:10.3390/biom9110664
- 32 Romão PVM, Palozi RAC, Guarnier LP, et al. Cardioprotective effects of *Plinia*  
*cauliflora* (Mart.) Kausel in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. J  
Ethnopharmacol 2019; 242: 112042. doi:10.1016/j.jep.2019.112042
- 33 Gasparotto A, Boffo MA, Lourenço ELB, et al. Natriuretic and diuretic effects of  
*Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. J Ethnopharmacol 2009; 122: 517–522.  
doi:10.1016/j.jep.2009.01.021
- 34 McGregor DD. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor  
Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of The Rat. J Physiol 1965; 177: 21–30.  
doi:10.1113/jphysiol.1965.sp007572

## Legends for Figures

**Fig. 1.** Representative histological sections of the heart, liver, kidney, and aorta artery from male rats with multiple cardiovascular risk factors treated with *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg). The black arrowheads show microvacuolization of the hepatocyte's cytoplasm. H&E (40×). EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; NC: negative control group.



391x258mm (200 x 200 DPI)

**Table 1.** Identified compounds from essential oil of *A. polystachya* (EOAP) by GC-MS

| Compound                   | RT (min) | Area (%) | RI   |
|----------------------------|----------|----------|------|
| $\alpha$ -Pinene           | 5.13     | 0.76     | 932  |
| NI                         | 5.96     | 0.27     | 966  |
| $\beta$ -Pinene            | 6.23     | 0.39     | 978  |
| $\beta$ -Myrcene           | 6.57     | 1.08     | 990  |
| Limonene                   | 7.77     | 40.13    | 1028 |
| (Z)- $\beta$ -Ocimene      | 8.03     | 0.21     | 1036 |
| Linalool                   | 10.25    | 0.28     | 1100 |
| (E)-p Mentha-2,8-dien-1-ol | 11.04    | 0.19     | 1121 |
| $\alpha$ -Terpineol        | 13.86    | 0.22     | 1191 |
| Carvone                    | 16.15    | 56.47    | 1246 |

RT: retention time; RI: retention index on RTX5MS



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 2.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on urinary parameters of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter                    | Naïve            | NC                          | EOAP 1                      | EOAP 2                        | EOAP 3                        | Rosuvastatin                  |
|------------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Urinary volume (mL/100g/24h) | 6.58 ± 1.80      | 5.24 ± 1.24                 | 5.32 ± 2.11                 | 6.00 ± 1.51                   | 6.95 ± 1.86                   | 6.32 ± 1.57                   |
| pH                           | 7.74 ± 0.71      | 7.55 ± 0.90                 | 7.42 ± 0.66                 | 7.48 ± 0.62                   | 7.25 ± 0.54                   | 7.18 ± 0.76                   |
| Density                      | 1023 ± 7.79      | 1024 ± 4.70                 | 1029 ± 7.79                 | 1023 ± 10.52                  | 1020 ± 5.60                   | 1023 ± 4.29                   |
| Chloride (µmol/100g/24h)     | 944.43 ± 114.55  | 668.77 ± 89.51 <sup>a</sup> | 695.99 ± 92.33 <sup>a</sup> | 828.67 ± 109.77 <sup>bc</sup> | 935.21 ± 119.28 <sup>bc</sup> | 835.21 ± 109.85 <sup>bc</sup> |
| Potassium (µmol/100g/24h)    | 1121.33 ± 192.33 | 1201.57 ± 232.21            | 1189.34 ± 212.33            | 1153.66 ± 199.87              | 1192.54 ± 187.33              | 1211.21 ± 177.43              |
| Sodium (µmol/100g/24h)       | 622.14 ± 92.21   | 381.22 ± 79.21 <sup>a</sup> | 393.45 ± 80.03 <sup>a</sup> | 518.21 ± 99.31 <sup>bc</sup>  | 621.44 ± 100.57 <sup>bc</sup> | 578.33 ± 99.67 <sup>bc</sup>  |
| Creatinine (mg/100g/24h)     | 2.77 ± 0.34      | 1.66 ± 0.33 <sup>a</sup>    | 1.73 ± 0.29 <sup>a</sup>    | 2.54 ± 0.29 <sup>bc</sup>     | 2.81 ± 0.40 <sup>bc</sup>     | 2.67 ± 0.38 <sup>bc</sup>     |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation; n = 8 rats per group). <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 when compared to NC group; <sup>c</sup>p ≤ 0.05 when compared to EOAP 1. EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; NC: negative control group.



**Table 3.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on electrocardiographic parameters of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter        | Naïve          | NC                          | EOAP 1                     | EOAP 2                      | EOAP 3                      | Rosuvastatin                |
|------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| P segment (ms)   | 31.75 ± 6.20   | 34.33 ± 5.00                | 31.71 ± 11.10              | 32.29 ± 7.61                | 34.33 ± 5.00                | 36.13 ± 5.51                |
| PR segment (ms)  | 41.00 ± 5.75   | 44.50 ± 7.39                | 45.86 ± 15.63              | 38.57 ± 11.65               | 44.50 ± 7.39                | 42.25 ± 7.20                |
| QRS segment (ms) | 45.50 ± 4.95   | 51.67 ± 9.07                | 48.14 ± 5.95               | 55.86 ± 9.35                | 51.67 ± 9.07                | 54.63 ± 9.24                |
| QT segment (ms)  | 98.75 ± 11.56  | 118.00 ± 5.06               | 98.71 ± 18.66              | 115.00 ± 16.31              | 118.00 ± 15.06              | 130.10 ± 26.02              |
| QTC segment (ms) | 155.10 ± 21.19 | 218.00 ± 30.25 <sup>a</sup> | 147.80 ± 54.8 <sup>b</sup> | 156.62 ± 23.16 <sup>b</sup> | 158.00 ± 20.25 <sup>b</sup> | 242.80 ± 38.51 <sup>a</sup> |
| P wave (mV)      | 0.047 ± 0.02   | 0.048 ± 0.02                | 0.025 ± 0.01               | 0.031 ± 0.01                | 0.048 ± 0.02                | 0.051 ± 0.02                |
| Q wave (mV)      | -0.01 ± 0.01   | -0.02 ± 0.01                | -0.05 ± 0.10               | -0.06 ± 0.10                | -0.02 ± 0.01                | -0.02 ± 0.02                |
| R wave (mV)      | 0.28 ± 0.05    | 0.32 ± 0.07                 | 0.24 ± 0.05                | 0.23 ± 0.07                 | 0.32 ± 0.07                 | 0.31 ± 0.11                 |
| S wave (mV)      | 0.007 ± 0.04   | -0.001 ± 0.03               | -0.085 ± 0.10              | -0.002 ± 0.03               | 0.010 ± 0.01                | -0.001 ± 0.03               |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation). n = 8 rats per group. <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 when compared to NC group. EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; NC: negative control group.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 4.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on blood pressure and heart rate values of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter   | Naïve         | NC                          | EOAP 1                      | EOAP 2                      | EOAP 3                      | Rosuvastatin                |
|-------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| SBP (mm Hg) | 99.57 ± 13.30 | 169.00 ± 24.52 <sup>a</sup> | 139.20 ± 24.24              | 137.70 ± 21.96              | 130.60 ± 20.28              | 141.60 ± 23.85              |
| DBP (mm Hg) | 51.39 ± 11.79 | 104.70 ± 21.26 <sup>a</sup> | 85.22 ± 12.86 <sup>ab</sup> | 86.55 ± 12.1 <sup>ab</sup>  | 99.53 ± 12.73 <sup>ab</sup> | 97.95 ± 18.55 <sup>ab</sup> |
| MAP (mm Hg) | 84.40 ± 23.02 | 131.00 ± 26.69              | 111.00 ± 17.62              | 113.1 ± 25.28               | 122.8 ± 26.97               | 119.5 ± 20.12               |
| HR (bpm)    | 405.7 ± 38.81 | 316.50 ± 31.07 <sup>a</sup> | 304.4 ± 24.58 <sup>a</sup>  | 308.40 ± 52.63 <sup>a</sup> | 298.40 ± 42.18 <sup>a</sup> | 289.80 ± 62.18 <sup>a</sup> |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation). n = 8 rats per group. <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 when compared to NC group. DBP: diastolic blood pressure; EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; HR: heart rate; MBP: mean blood pressure; NC: negative control group; SBP: systolic blood pressure.

**Table 5.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on biochemical parameters of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter          | <i>Naïve</i>  | <i>NC</i>                  | <i>EOAP 1</i>               | <i>EOAP 2</i>               | <i>EOAP 3</i>               | <i>Rosuvastatin</i>           |
|--------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| AST (U/L)          | 56.2 ± 10.4   | 54.7 ± 8.2                 | 51.8 ± 8.3                  | 54.5 ± 9.3                  | 55.2 ± 8.8                  | 56.7 ± 9.2                    |
| ALT (U/L)          | 33.4 ± 7.3    | 34.1 ± 7.1                 | 33.5 ± 8.1                  | 35.1 ± 8.7                  | 35.6 ± 8.1                  | 36.2 ± 7.8                    |
| TG (mg/dL)         | 77.3 ± 6.45   | 156.1 ± 10.03 <sup>a</sup> | 136.4 ± 11.03 <sup>a</sup>  | 127.5 ± 12.55 <sup>a</sup>  | 128.9 ± 13.21 <sup>a</sup>  | 95.3 ± 11.21 <sup>bcd</sup>   |
| TC (mg/dL)         | 92.1 ± 4.77   | 298.7 ± 31.21 <sup>a</sup> | 277.8 ± 27.44 <sup>a</sup>  | 263.4 ± 32.64 <sup>a</sup>  | 259.65 ± 35.77 <sup>a</sup> | 134.2 ± 10.44 <sup>bcde</sup> |
| HDL-C (mg/dL)      | 42.5 ± 7.54   | 85.1 ± 9.21 <sup>a</sup>   | 72.2 ± 7.54 <sup>a</sup>    | 79.4 ± 6.98 <sup>a</sup>    | 68.7 ± 8.77 <sup>a</sup>    | 65.4 ± 6.22 <sup>a</sup>      |
| LDL-C (mg/dL)      | 40.2 ± 5.32   | 144.2 ± 13.3 <sup>a</sup>  | 132.7 ± 11.2 <sup>a</sup>   | 136.1 ± 14.8 <sup>a</sup>   | 131.1 ± 10.7 <sup>a</sup>   | 82.1 ± 7.11 <sup>abcde</sup>  |
| VLDL-C (mg/dL)     | 22.1 ± 3.21   | 71.4 ± 8.33 <sup>a</sup>   | 73.1 ± 6.77 <sup>a</sup>    | 64.5 ± 7.23 <sup>a</sup>    | 70.2 ± 7.21 <sup>a</sup>    | 41.6 ± 5.33 <sup>abcde</sup>  |
| oxLDL (ng/mL)      | 0.22 ± 0.04   | 2.01 ± 0.45 <sup>a</sup>   | 0.31 ± 0.08 <sup>b</sup>    | 0.27 ± 0.06 <sup>b</sup>    | 0.25 ± 0.06 <sup>b</sup>    | 1.23 ± 0.77 <sup>acde</sup>   |
| NT (μmol/L)        | 0.010 ± 0.002 | 0.033 ± 0.008 <sup>a</sup> | 0.012 ± 0.003 <sup>b</sup>  | 0.013 ± 0.003 <sup>b</sup>  | 0.011 ± 0.003 <sup>b</sup>  | 0.027 ± 0.007 <sup>acde</sup> |
| MDA (mmol/L)       | 1.21 ± 0.08   | 4.92 ± 0.54 <sup>a</sup>   | 1.35 ± 0.09 <sup>b</sup>    | 1.27 ± 0.07 <sup>b</sup>    | 1.29 ± 0.08 <sup>b</sup>    | 4.2 ± 0.66 <sup>acde</sup>    |
| sVCAM-1 (ng/L)     | 2.35 ± 0.12   | 4.63 ± 0.55 <sup>a</sup>   | 3.31 ± 0.14 <sup>ab</sup>   | 3.26 ± 0.10 <sup>ab</sup>   | 3.25 ± 0.11 <sup>ab</sup>   | 3.30 ± 0.10 <sup>ab</sup>     |
| sICAM-1 (ng/L)     | 4.77 ± 0.45   | 9.37 ± 0.45 <sup>a</sup>   | 6.54 ± 0.78 <sup>ab</sup>   | 6.66 ± 0.80 <sup>ab</sup>   | 6.61 ± 0.59 <sup>ab</sup>   | 6.21 ± 0.53 <sup>ab</sup>     |
| IL-6 (ng/L)        | 143.0 ± 12.43 | 350.1 ± 38.2 <sup>a</sup>  | 241.0 ± 10.22 <sup>ab</sup> | 252.4 ± 11.54 <sup>ab</sup> | 259.7 ± 9.77 <sup>ab</sup>  | 260.0 ± 11.77 <sup>ab</sup>   |
| IL-1 beta (pg/mL)  | 321.3 ± 27.65 | 616.4 ± 35.2 <sup>a</sup>  | 484.0 ± 15.05 <sup>ab</sup> | 461.2 ± 21.55 <sup>ab</sup> | 477.2 ± 19.56 <sup>ab</sup> | 469.9 ± 22.22 <sup>ab</sup>   |
| Urea (mg/dL)       | 33.5 ± 3.54   | 35.3 ± 4.21                | 31.7 ± 5.33                 | 37.8 ± 6.99                 | 39.7 ± 6.88                 | 33.9 ± 6.11                   |
| Creatinine (mg/dL) | 0.47 ± 0.07   | 1.27 ± 0.13 <sup>a</sup>   | 0.78 ± 0.05 <sup>ab</sup>   | 0.70 ± 0.06 <sup>ab</sup>   | 0.80 ± 0.08 <sup>ab</sup>   | 0.77 ± 0.06 <sup>ab</sup>     |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation; n = 8 rats per group). <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 when compared to NC group; <sup>c</sup>p ≤ 0.05 when compared to EOAP 1; <sup>d</sup>p ≤ 0.05 when compared to EOAP 2; <sup>e</sup>p ≤ 0.05 when compared to EOAP 3. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; IL-6: interleukin-6; IL-1: interleukin-1; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; MDA: malondialdehyde; NC: negative control; NT: nitrotyrosine; oxLDL: oxidized low-density lipoprotein; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; VLDL-C: very-low-density lipoprotein cholesterol.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 6.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on mesenteric vascular reactivity of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter         | Naïve           | NC                          | EOAP 1                      | EOAP 2                      | EOAP 3                     | Rosuvastatin               |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Phe</i> (nmol) |                 |                             |                             |                             |                            |                            |
| 30                | 97.35 ± 19.76   | 68.71 ± 37.79               | 64.31 ± 34.80               | 72.52 ± 28.24               | 71.79 ± 20.39              | 73.12 ± 29.99              |
| 100               | 242.50 ± 79.2   | 246.60 ± 49.3               | 186.81 ± 76.99              | 194.20 ± 43.3               | 172.60 ± 63.3              | 153.00 ± 74.7              |
| 300               | 395.75 ± 116.78 | 339.7 ± 157.9               | 333.8 ± 167.98              | 238.4 ± 209.3               | 242.9 ± 151.8              | 276.6 ± 175.5              |
| <i>ACh</i> (nmol) |                 |                             |                             |                             |                            |                            |
| 30                | -30.33 ± 13.31  | -26.44 ± 17.44              | -31.13 ± 15.12              | -33.21 ± 15.21              | -34.55 ± 15.58             | -35.11 ± 15.44             |
| 100               | -51.2 ± 17.02   | -54.61 ± 17.58              | -57.11 ± 13.12              | -56.57 ± 14.06              | -50.21 ± 19.31             | -51.39 ± 15.52             |
| 300               | -77.68 ± 24.4   | -32.34 ± 11.21 <sup>a</sup> | -73.09 ± 17.55 <sup>b</sup> | -80.33 ± 29.35 <sup>b</sup> | -78.14 ± 31.8 <sup>b</sup> | -75.6 ± 24.98 <sup>b</sup> |
| <i>SNP</i> (nmol) |                 |                             |                             |                             |                            |                            |
| 3                 | -33.4 ± 11.55   | -34.33 ± 16.21              | -41.21 ± 10.33              | -47.32 ± 14.33              | -44.32 ± 14.00             | -39.31 ± 15.44             |
| 10                | -49.16 ± 22.71  | -45.87 ± 24.82              | -48.21 ± 26.64              | -56.15 ± 23.77              | -58.44 ± 22.13             | -52.12 ± 21.33             |
| 30                | -60.62 ± 25.87  | -70.95 ± 22.08              | -72.12 ± 20.32              | -56.34 ± 25.63              | -72.33 ± 25.11             | -77.32 ± 24.34             |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation). n = 8 rats per group. <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 when compared to NC group. ACh: acetylcholine; EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; NC: negative control group; Phe: phenylephrine; SNP: sodium nitroprusside.

**Table 7.** Effects of treatment with essential oil of *Aloysia polystachya* (dose 1: 1.47 mg/kg; dose 2: 4.40; dose 3: 13.20 mg/kg) and rosuvastatin (5 mg/kg) on relative organ weight and cardiac morphometry of male rats with multiple cardiovascular risk factors

| Parameter            | <i>Naïve</i> | <i>NC</i>                | <i>EOAP 1</i>            | <i>EOAP 2</i>            | <i>EOAP 3</i>            | <i>Rosuvastatin</i>      |
|----------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Heart (%)            | 0.21 ± 0.01  | 0.32 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.36 ± 0.09 <sup>a</sup> | 0.34 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.33 <sup>a</sup> ± 0.03 | 0.33 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| Lung (%)             | 0.31 ± 0.03  | 0.33 ± 0.05              | 0.35 ± 0.04              | 0.34 ± 0.02              | 0.35 ± 0.02              | 0.35 ± 0.03              |
| Spleen (%)           | 0.14 ± 0.02  | 0.14 ± 0.01              | 0.13 ± 0.01              | 0.13 ± 0.01              | 0.13 ± 0.02              | 0.12 ± 0.02              |
| Right kidney (%)     | 0.28 ± 0.02  | 0.30 ± 0.02              | 0.32 ± 0.02              | 0.32 ± 0.03              | 0.30 ± 0.02              | 0.30 ± 0.05              |
| Left kidney (%)      | 0.27 ± 0.02  | 0.32 ± 0.02              | 0.31 ± 0.02              | 0.31 ± 0.03              | 0.30 ± 0.02              | 0.30 ± 0.05              |
| Liver (%)            | 2.72 ± 0.31  | 4.34 ± 0.28 <sup>a</sup> | 4.32 ± 0.44 <sup>a</sup> | 4.48 ± 0.62 <sup>a</sup> | 4.23 ± 0.40 <sup>a</sup> | 4.31 ± 0.79 <sup>a</sup> |
| Right ventricle (mm) | 0.91 ± 0.14  | 0.88 ± 0.18              | 1.03 ± 0.11              | 0.95 ± 0.10              | 0.87 ± 0.06              | 0.91 ± 0.16              |
| Left ventricle (mm)  | 1.25 ± 0.18  | 1.30 ± 0.20              | 1.34 ± 0.19              | 1.30 ± 0.19              | 1.35 ± 0.09              | 1.47 ± 0.20              |
| IV septum (mm)       | 2.19 ± 0.35  | 2.77 ± 0.70              | 2.60 ± 0.22              | 2.80 ± 0.24              | 2.58 ± 0.11              | 2.57 ± 0.15              |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Values are expressed as mean ± SD (standard deviation). n = 8 rats per group. <sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to naïve group. EOAP: essential oil of *Aloysia polystachya*; IV: interventricular septum; NC: negative control group.

## OUTRAS PRODUÇÕES

**Capítulo de Livro: Ka'á Jaguá (*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae)):  
From Traditional Use to Pharmacological Investigations in Relation to Cardiovascular  
Disease**

Livro: Ancient and Traditional Foods, Plants, Herbs and Spices used in Cardiovascular Health  
and Disease

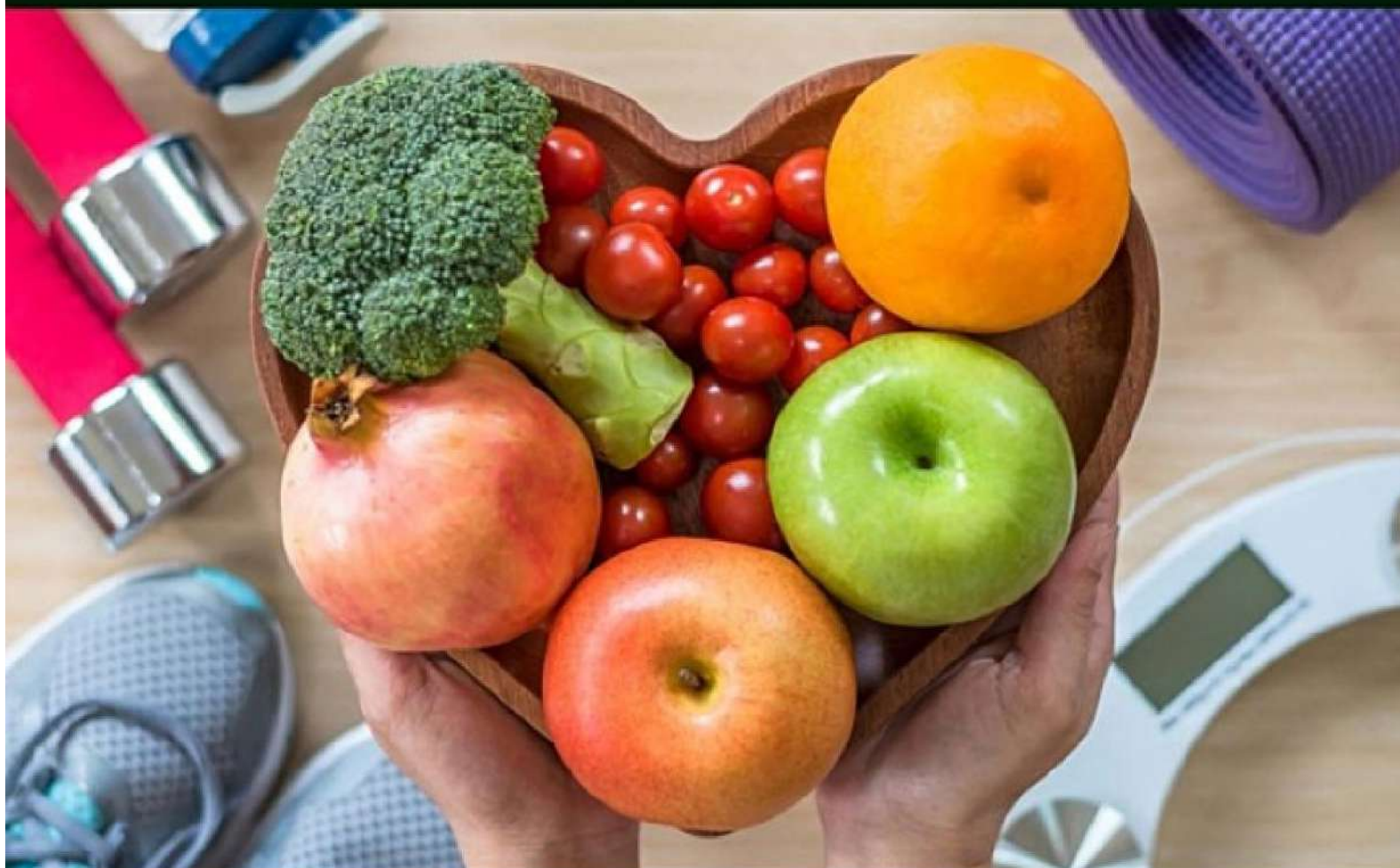
Editores: Rajkumar Rajendram, Victor Preedy, Vinood Patel



# Ancient and Traditional Foods, Plants, Herbs and Spices used in Cardiovascular Health and Disease

EDITED BY

Rajkumar Rajendram, Victor R. Preedy,  
and Vinood B. Patel



CRC Press  
Taylor & Francis Group



First edition published 2023

by CRC Press

6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742

and by CRC Press

4 Park Square, Milton Park, Abingdon, Oxon, OX14 4RN

*CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, LLC*

© 2024 selection and editorial matter, Victor R. Preedy, Vinood B. Patel, and Rajkumar Rajendram; individual chapters, the contributors

Reasonable efforts have been made to publish reliable data and information, but the author and publisher cannot assume responsibility for the validity of all materials or the consequences of their use. The authors and publishers have attempted to trace the copyright holders of all material reproduced in this publication and apologize to copyright holders if permission to publish in this form has not been obtained. If any copyright material has not been acknowledged please write and let us know so we may rectify in any future reprint.

Except as permitted under U.S. Copyright Law, no part of this book may be reprinted, reproduced, transmitted, or utilized in any form by any electronic, mechanical, or other means, now known or hereafter invented, including photocopying, microfilming, and recording, or in any information storage or retrieval system, without written permission from the publishers.

For permission to photocopy or use material electronically from this work, access [www.copyright.com](http://www.copyright.com) or contact the Copyright Clearance Center, Inc. (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, 978-750-8400. For works that are not available on CCC please contact [mpkbookspermissions@tandf.co.uk](mailto:mpkbookspermissions@tandf.co.uk)

*Trademark notice:* Product or corporate names may be trademarks or registered trademarks and are used only for identification and explanation without intent to infringe.

*Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*

Names: Patel, Vinood B., editor. | Preedy, Victor R., editor. | Rajendram, Rajkumar, editor.

Title: Ancient and traditional foods, plants, herbs and spices used in cardiovascular health and disease / edited by Vinood B. Patel, Victor R. Preedy, and Rajkumar Rajendram.

Description: First edition. | Boca Raton : CRC Press, 2023. | Includes bibliographical references. | Summary: "The use of different foods, herbs and spices to treat or prevent disease has been recorded for thousands of years, however, there are fundamental questions pertaining to the scientific evidence for the use of these agents in modern medicine. This book investigates the use of foods, herbs, plants and spices for properties which may be beneficial in the treatment of cardiovascular disease. It provides information on diets; specific agents, items, and extracts; resources; and each chapter focuses on a plant-derived material providing a historical background, uses, toxicity and cautionary notes and summary points"— Provided by publisher.

Identifiers: LCCN 2022060969 (print) | LCCN 2022060970 (ebook) | ISBN 9781032108582 (hardback) | ISBN 9781032115344 (paperback) | ISBN 9781003220329 (ebook)

Subjects: LCSH: Cardiovascular system—Diseases—Diet therapy. | Cardiovascular system—Diseases—Alternative treatment. | Cardiovascular system—Diseases—Prevention. | Heart—Diseases—Diet therapy. | Heart—Diseases—Alternative treatment. | Heart—Diseases—Prevention.

Classification: LCC RC684.D5 A53 2023 (print) | LCC RC684.D5 (ebook) | DDC 616.1/0654—dc23/eng/20230406  
LC record available at <https://lcn.loc.gov/2022060969>

LC ebook record available at <https://lcn.loc.gov/2022060970>

ISBN: 978-1-032-10858-2 (hbk)

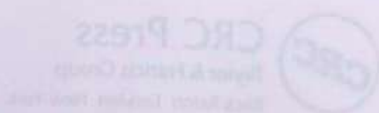
ISBN: 978-1-032-11534-4 (pbk)

ISBN: 978-1-003-22032-9 (ebk)

DOI: 10.1201/9781003220329

Typeset in Times

by Apex CoVantage, LLC





# Contents

[Editors](#)

[Contributors](#)

## **SECTION I Overviews and Dietary Components**

### **Chapter 1** Connecting the Link between Oxidative Stress, Dietary Antioxidants and Hypertension

*Sukhchain Kaur, Tushar Midha, Oyndril Dutta, Om Prakash Saini, Rasmi Ranjan Muduli, Anil K. Mantha and Monisha Dhiman*

### **Chapter 2** Domestic and International Research on the Relationship between Japanese Diet and Ischemic Heart Disease

*Tomoko Imai and Hiroshi Shimokata*

### **Chapter 3** Olive Oil and Other Oils as a Part of Traditional Diets and Bioactive Compounds for Cardioprotection

*Estefanía Sánchez Rodríguez, Laura Alejandra Vázquez Aguilar and María Dolores Mesa García*

### **Chapter 4** Herbs and Molecular Basis of Cardiovascular Protection

*Shubhang Joshi, Vinay M. Paliwal, Vikram Vamsi Priya and Bidya Dhar Sahu*

### **Chapter 5** Seaweed in Traditional Diets and Relationship with Cardiovascular Disease Incidence and Mortality

*Kazumasa Yamagishi, Wanlu Sun and Hiroyasu Iso*

## **SECTION II Specific Agents, Items and Extracts**

### **Chapter 6** Asiatic Pennywort (*Centella asiatica*) and Cardiovascular Protection: A New Narrative

*Chin Theng Ng, Siau Hui Mah and Lai Yen Fong*

### **Chapter 7** *Terminalia arjuna* and Cardiovascular Protection: A Comprehensive Overview

*Aashis Dutta and Manas Das*

**Chapter 8** [Baicalein Extract from Chinese Herbal Medicine to Use in Cardiovascular Diseases: Focus on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury](#)

[Ramona D'Amico, Salvatore Cuzzocrea and Rosanna Di Paola](#)

**Chapter 9** Balloon Vine (*Cardiospermum halicacabum* L.) and Cardiovascular Protection: Cellular, Molecular and Metabolic Aspects

*A. Rajasekaran, R. Arivukkarasu and G. Venkatesh*

**Chapter 10** Black Cumin (*Nigella sativa*): Biological Activities and Molecular Aspects in Relation to Cardiovascular Disease

*Maryam Moradi Binabaj and Fereshteh Asgharzadeh*

**Chapter 11** Date Palm (*Phoenix dactylifera*) and Cardiovascular Protection: Molecular, Cellular and Physiological Aspects

*Heba Abd Elghany Sahyon*

**Chapter 12** The Beneficial Action of *Artemisia* Genus on the Cardiovascular System

*Smail Amtaghri and Mohamed Eddouks*

**Chapter 13** Kalmegh (*Andrographis paniculata*) and Cardioprotective Mechanisms

*Vuanghao Lim, Jun Jie Tan and Yoke Keong Yong*

**Chapter 14** Ka'á Jaguá (*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae)): From Traditional Use to Pharmacological Investigations in Relation to Cardiovascular Disease

[Jane Manfron, Karyne Garcia Tafarelo Moreno, Vanessa Samudio Santos Zanuncio, Denise Brentan Silva and Arquimedes Gasparotto Junior](#)

**Chapter 15** *Bridelia ferruginea* and Myocardial Protection in Mitochondrial Membrane Permeability

*Oluwatoyin O. Ojo*

**Chapter 16** Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) and Cardiovascular Disease

*Brian Tomlinson, Sze Wa Chan and Paul Chan*

**Chapter 17** Mexican Orchid (*Prosthechea karwinskii*) and Use in Cardiovascular Protection: Cellular and Physiological Aspects

*Luicita Lagunez Rivera, Gabriela Soledad Barragan Zarate, Rodolfo Solano, Alfonso Alexander Aguilera and Aracely E. Chavez Piña*

## Ka'á Jaguá (*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae))

### *From Traditional Use to Pharmacological Investigations in Relation to Cardiovascular Disease*

Jane Manfron, Karyne Garcia Tafarelo Moreno, Vanessa Samudio Santos Zanuncio, Denise Brentan Silva and Arquimedes Gasparotto Junior

DOI: 10.1201/9781003220329-16

## CONTENTS

### 14.1 Introduction

14.1.1 Pharmacobotany and Traditional Use

14.1.2 Pharmacological Investigations

14.1.3 Safety Evaluations

14.1.4 Chemical Constituents

14.1.5 Other Foods, Herbs, Spices and Botanicals Used in Cardiovascular Health and Disease

### 14.2 Summary Points

### References

## LIST OF ABBREVIATIONS

GABA<sub>A</sub>  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A

GC-MS Gas chromatography coupled to mass spectrometry

HAM-A Hamilton Anxiety Rating Scale

IC<sub>50</sub> Half maximal inhibitory concentration

LC-MS Liquid chromatography coupled to mass spectrometry

NCI National Cancer Institute

SHR Spontaneous hypertensive rats

TRIOX 6-hydroxy-2,5, 7, 8-tetramethyl-chroman-carboxylic acid

VO Volatile oil

## 14.1 INTRODUCTION

The genus *Aloysia* Paláu belongs to the family Verbenaceae and comprises 46 species. The genus occurs in subtropical and temperate South America extending from the southern region of United States and Mexico to Chile and Central Argentina. In South America, it is represented by 28 species and six varieties (O'Leary et al. 2016; O'Leary and Moroni 2020). Species of *Aloysia* are aromatic, with an intense lemon-like aroma. They are economically and medically significant due to their essential oils with biological activities (Mohammadhosseini et al. 2021).

One of the most important species of the genus is *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (synonym *Lippia polystachya* Griseb.) and it is native to the southern region of Bolivia and northern region of Argentina (O'Leary et al. 2016; Royal Botanic Gardens 2021). It is also commonly cultivated as an ornamental and medicinal plant. *Aloysia polystachya* is commonly known as *ka'á jaguá*, *burrito*, *té-burro*, *poleo-riojano*, *poleo-de-castilla*, *aloisia* or *erva-serrana* (mountain grass). The generic name *Aloysia* was in honor of

**Artigo 3: Revista Journal of Medicinal Food (FI 2.4)**

<https://home.liebertpub.com/publications/journal-of-medicinal-food/38/for-authors>

Open camera or QR reader and  
scan code to access this article  
and other resources online.



## Evidence of the Cardioprotective Effects of *Aloysia polystachya* in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats

Karyne Garcia Tafarelo Moreno,<sup>1</sup> Thiago Lima de Almeida,<sup>1</sup> Aline Aparecida Macedo Marques,<sup>1</sup> Guilherme Donadel,<sup>2</sup> Emerson Luiz Botelho Lourenço,<sup>2</sup> Danielle Ayr Tavares de Almeida,<sup>1</sup> and Arquimedes Gasparotto Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Pre-Clinical Research of Natural Products, Postgraduate Program in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products, Paranaense University, Umuarama, Brazil.

**ABSTRACT** *Aloysia polystachya* is a plant species that is widely used in Brazilian folk medicine for the treatment of different disorders that affect the cardiovascular system. The aim of the study was to investigate the cardioprotective effects of an ethanol-soluble fraction of *A. polystachya* (ESAP) on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Different groups of rats ( $n=8$ ) were orally treated with ESAP (30, 100, and 300 mg/kg), carvedilol (10 mg/kg), or vehicle (filtered water; 1 mL/100 g) for 7 days. Naive rats received no treatment. On the morning of day 6, acute myocardial infarction was induced by the acute oral administration of isoproterenol (100 mg/kg). On the morning of day 8, all rats underwent electrocardiography and transthoracic echocardiography. Blood samples were then collected, and serum levels of creatine kinase-MB fraction (CK-MB) and cardiac troponin T (cTNT) were quantified. ESAP significantly reduced electrocardiographic changes, improved the ventricular ejection fraction, and reduced serum levels of CK-MB and cTNT in infarcted rats. The cardioprotective effects of ESAP could be exploited as an effective tool against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.

**KEYWORDS:** • creatine kinase • heart attack • troponin • Verbenaceae

### INTRODUCTION

**A** LOYSIA POLYSTACHYA (Griseb) Moldenke (Verbenaceae) is a plant species that is widely distributed in South America, especially in Paraguay and Brazil.<sup>1</sup> Popularly known as “Burrito,” this species is commonly used for its aroma and to give a minty flavor to traditional Brazilian beverages (e.g., “Tereré”). In folk medicine, healers in the region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul state, Brazil, recommend this species for the treatment of various disorders that affect the cardiovascular system.<sup>2</sup> *A. polystachya* is also used in traditional medicine to treat hypertension, anxiety, gastrointestinal, and respiratory disorders, as sedative and as digestive.<sup>2–4</sup>

A recent phytochemical study of an ethanol-soluble fraction of *A. polystachya* (ESAP) that was obtained from the leaves of *A. polystachya* that were collected in this region detected the abundant presence of organic acids, nucleosides, methoxylated flavones, and glycosylated compounds, including phenolic acids, phenylpropanoids, iridoids, and monoterpenes.<sup>5</sup> Marchetti et al<sup>6</sup> and Carmona et al<sup>7</sup> also detected the presence of forsythoside A, plantainoside C, purpureaside D, martynoside, acteoside, carvone, and limonene in the leaves of this species.

Several biological activities have been ascribed to this species. Anxiolytic- and antidepressant-like,<sup>4,7,8</sup> anticancer,<sup>9</sup> anesthetic,<sup>10</sup> and repellent<sup>11</sup> effects have been reported with different preparations of *A. polystachya*. Marques et al<sup>5</sup> found that prolonged oral ESAP administration in spontaneously hypertensive rats reversed renal, hemodynamic, electrocardiographic, and cardiac morphological changes that were induced by hypertension.

Despite evidence of the popular use and beneficial effects of *A. polystachya* for the treatment of heart disease, its effects on the prevention and evolution of myocardial

Manuscript received 22 February 2022. Revision accepted 5 November 2022.

Address correspondence to: Arquimedes Gasparotto Junior, PhD, Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFaC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, P.O. Box 533, Dourados 79804-970, Mato Grosso do Sul, Brazil, E-mail: arquimedesgasparotto@gmail.com

infarction (MI) remain unknown. Thus, the present study investigated the cardioprotective effects of ESAP in a rat model of isoproterenol-induced MI.

## MATERIALS AND METHODS

### *Drugs and salts*

Ketamine and xylazine hydrochloride were purchased from Syntec (São Paulo, SP, Brazil). Heparin was purchased from Hipolabor (Belo Horizonte, MG, Brazil). Carvedilol (CVDL) and isoproterenol (ISO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were obtained in analytical grade.

### *Plant material and extract preparation*

*A. polystachya* leaves were collected in the Dourados region, Mato Grosso do Sul state, Brazil (21°13'15"S, 54°48'21"N). A voucher specimen was authenticated by Dr. Zefa Valivina Pereira and deposited in the Federal University of Grande Dourados (UFGD) herbarium (no. 5536). The plant name was confirmed in "The Plant List" database (<http://www.theplantlist.org/>; accessed April 13, 2021). The infusion was obtained by Marques et al.<sup>5</sup> In this work, the infusion was treated with ethanol (95%) at a proportion of 1:3 (v/v), resulting in a precipitate and ethanol-soluble fraction (ESAP; 13% yield). The ESAP was concentrated, freeze-dried, and stored at -18°C. The detailed phytochemical composition of the ESAP was recently reported.<sup>5</sup>

### *Cardioprotective studies*

**Animals.** We used 48 male Wistar rats 20 weeks old. All animals were obtained from the vivarium at UFGD. All rats were kept in an animal room with controlled temperature (22°C ± 2°C) and humidity (54% ± 2%) under a 12-h light/12-h dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, UFGD (protocol No. 21/2019).

### *Induction of acute MI, treatments, and clinical evaluations*

The rats were randomly divided into six different groups ( $n=8$ /group). The naive and negative control (NC) groups were treated only with vehicle (1 mL/100 g body weight). The positive control (PC) group received CVDL orally (10 mg/kg). The ESAP groups received 30, 100, and 300 mg/kg ESAP by gavage. All treatments were performed once daily for 7 days.

On the morning of day 6, MI was induced in the ESAP, NC, and PC groups by the acute oral administration of ISO (100 mg/kg). On the morning of day 8, all rats were intramuscularly anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and underwent electrocardiography (ECG) using a 12-lead ECG recorder (WinCardio, Micro-med, Brasília, Brazil) according to Guarnier et al.<sup>12</sup> Trans-thoracic echocardiography was then performed using an Ecol Hipermedic echocardiograph (Hipermedic, Porto

Alegre, RS, Brazil). Immediately after echocardiography, blood samples were collected through the jugular vein. Serum was obtained, and levels of creatine kinase-MB fraction (CK-MB) and cardiac troponin T (cTNT) were quantified using an automated biochemical analyzer (Cobas Integra 400 plus, Roche).

### *Statistical analyses*

The results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of  $n=8$  rats/group. The statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. Values of  $P<.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, acute treatment with ISO (100 mg/kg) significantly increased serum levels of CK-MB and cTNT in normotensive rats after 24 h of administration, indicating direct myocardium damage (Table 1). We detected a significant increase in ECG QT and QRS segments (Table 2) and decreases in the systole diameter and ventricular ejection fraction (Table 1). Treatment with CVDL and ESAP (at all doses tested) prevented all changes, maintaining values of the various biochemical, electrocardiographic, and echocardiographic parameters similar to those in naive animals.

Cardiovascular diseases currently represent ~30% of all deaths worldwide. Among the main causes of death and other important cardiovascular sequelae, MI is notable. Myocardial infarction can lead to necrosis and the persistent scarring of cardiomyocytes, causing additional morbid pathological sequelae.<sup>13</sup> The diagnosis of MI is based on measurements of serum markers, including CK-MB and cTNT. The detection of intracoronary thrombi and electrocardiographic changes and abnormalities of cardiac motility and the ejection fraction may be important indications of MI.<sup>13–15</sup>

Cardiac troponin is detectable in three forms: cTNT, troponin I (cTNI), and troponin C (cTNC). cTNT is a component of the heterotrimeric complex to which tropomyosin is associated and directly responsible for the myocardial contractile process. This protein is exclusive to cardiomyocytes. Elevations of cTNT suggest cardiac muscle injury. cTNT levels generally begin to increase within 2–4 h after the onset of the myocardial necrosis process, reaching maximum values after 24–48 h. Troponin has the same diagnostic sensitivity as the CK-MB enzyme 12–48 h after the onset of infarction symptoms, but troponin is essential for patients with diseases that reduce the specificity of the CK-MB.<sup>14</sup>

Another useful tool for IM diagnosis is ECG. Although some infarcted patients have a normal ECG, some ECG changes are significantly related to MI, including new significant ST-segment-T wave or new left bundle branch block. Furthermore, the development of pathological Q waves may also be present.<sup>13</sup> Although echocardiography is important for detecting several cardiac diseases, it is not always suitable for detecting acute MI. Echocardiography is

TABLE 1. EFFECTS OF THE ETHANOL-SOLUBLE FRACTION FROM *ALOYSIA POLYSTACHYA* LEAVES AND CARVEDILOL ON BIOCHEMICAL AND ECHOCARDIOGRAPHIC PARAMETERS

| Parameter         | Naive          | NC                          | ESAP (30 mg/kg)             | ESAP (100 mg/kg)             | ESAP (300 mg/kg)             | CVDL (10 mg/kg)             |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Biochemical       |                |                             |                             |                              |                              |                             |
| CK-MB (U/L)       | 66.33 ± 10.09  | 201.23 ± 22.11 <sup>a</sup> | 140.2 ± 15.16 <sup>ab</sup> | 133.22 ± 19.44 <sup>ab</sup> | 141.32 ± 22.23 <sup>ab</sup> | 87.2 ± 14.22 <sup>bc</sup>  |
| cTNT (μg/L)       | 0.12 ± 0.02    | 0.82 ± 0.03 <sup>a</sup>    | 0.52 ± 0.02 <sup>ab</sup>   | 0.46 ± 0.03 <sup>ab</sup>    | 0.50 ± 0.02 <sup>ab</sup>    | 0.13 ± 0.03 <sup>bc</sup>   |
| Echocardiographic |                |                             |                             |                              |                              |                             |
| HR (bpm)          | 232.10 ± 21.60 | 153.50 ± 24.93 <sup>a</sup> | 196.63 ± 37.22              | 198.88 ± 26.18               | 191.25 ± 29.36               | 224.25 ± 22.95 <sup>b</sup> |
| SD (mm)           | 0.13 ± 0.03    | 0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>    | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>    |
| DD (mm)           | 0.41 ± 0.07    | 0.42 ± 0.06                 | 0.42 ± 0.08                 | 0.39 ± 0.03                  | 0.41 ± 0.03                  | 0.44 ± 0.07                 |
| FDV (mL)          | 0.18 ± 0.07    | 0.19 ± 0.08                 | 0.19 ± 0.09                 | 0.16 ± 0.03                  | 0.17 ± 0.04                  | 0.18 ± 0.05                 |
| FSV (mL)          | 0.01 ± 0.01    | 0.01 ± 0.01                 | 0.01 ± 0.01                 | 0.01 ± 0.01                  | 0.01 ± 0.01                  | 0.01 ± 0.01                 |
| SV (mL)           | 0.18 ± 0.02    | 0.17 ± 0.02                 | 0.18 ± 0.03                 | 0.14 ± 0.03                  | 0.16 ± 0.04                  | 0.19 ± 0.04                 |
| EF (%)            | 96.26 ± 1.34   | 83.01 ± 2.60 <sup>a</sup>   | 96.71 ± 2.71 <sup>b</sup>   | 95.30 ± 2.68 <sup>b</sup>    | 96.19 ± 2.35 <sup>b</sup>    | 97.39 ± 2.60 <sup>b</sup>   |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as mean ± SEM of eight animals per group.

<sup>a</sup>*P* < .05 compared to the naive rats.

<sup>b</sup>Denotes *P* < .05 compared to the NC.

<sup>c</sup>Denotes *P* < .05 compared to the ESAP (30, 100, or 300 mg/kg).

ANOVA, analysis of variance; CK-MB, creatine kinase-MB fraction; cTNT, cardiac troponin T; CVDL, carvedilol; DD, diastole diameter; ESAP, ethanol-soluble fraction of *A. polystachya*; EF, ejection fraction; FDV, final diastolic volume; FSV, final systolic volume; HR, heart rate; NC, negative control; SD, systole diameter; SEM, standard error of the mean; SV, stroke volume.

often useful for monitoring complications that occur after MI, including ventricular wall rupture, mitral valve regurgitation, and other alterations in ventricular function.<sup>15</sup>

Isoproterenol is known to increase oxidative stress<sup>16</sup> and lipid peroxidation in cardiac muscle cells.<sup>17</sup> It also mediates calcium overload,<sup>18</sup> renin-angiotensin release,<sup>19</sup> and inflammation<sup>20</sup> in the myocardium, resulting in infarct-like necrosis. Beta-blocking drugs, such as CVDL, are routinely used to prevent MI. Its cardioprotective effect is related to the direct reduction of cardiac overload. In addition, beta blockers also reduce pre- and post-load by reducing renin release by renal juxtaglomerular cells, resulting in lower activation of the renin-angiotensin-aldosterone system.<sup>21</sup>

Although we did not investigate the molecular mechanisms of the cardioprotective effects of ESAP, some previous studies suggest some possibilities. In a recent study, Marques et al<sup>5</sup> reported the presence of organic acids,

methoxylated flavones, and glycosylated compounds, including phenolic acids, phenylpropanoids, iridoids, and monoterpenes, in the ESAP. These authors showed that prolonged treatment with the ESAP in spontaneously hypertensive rats modulated the tissue antioxidant system in heart, kidney, and aorta samples, resulting in significant antioxidant effects.

Several studies have shown that different natural products, including flavonoids and other phenolic compounds, effectively prevent ISO-induced MI through antioxidant activities and the prevention of lipid peroxidation.<sup>22</sup> Thus, luteolin,<sup>23</sup> safranal,<sup>24</sup> curcumin, and quercetin<sup>25</sup> deserve to be highlighted. The present findings suggest that the ESAP may exert a cardioprotective response through its antioxidant effects and protection against lipid peroxidation in the myocardium. Future studies should further test possible nutraceutical products based on the ESAP for the prevention of ISO-induced toxicity.

TABLE 2. EFFECTS OF THE ETHANOL-SOLUBLE FRACTION FROM *ALOYSIA POLYSTACHYA* LEAVES AND CARVEDILOL ON ELECTROCARDIOGRAPHIC PARAMETERS

|               | Naive          | NC                          | ESAP (30 mg/kg)            | ESAP (100 mg/kg)           | ESAP (300 mg/kg)           | CVDL (10 mg/kg)             |
|---------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Segments (ms) |                |                             |                            |                            |                            |                             |
| PR            | 35.00 ± 4.96   | 36.43 ± 17.08               | 42.88 ± 12.17              | 50.88 ± 12.11              | 45.13 ± 10.82              | 40.88 ± 6.83                |
| QRS           | 46.25 ± 3.41   | 145.71 ± 9.57 <sup>a</sup>  | 59.25 ± 15.76 <sup>b</sup> | 65.75 ± 21.72 <sup>b</sup> | 79.88 ± 34.79 <sup>b</sup> | 49.75 ± 12.67 <sup>b</sup>  |
| QT            | 104.5 ± 10.77  | 150.14 ± 8.95 <sup>a</sup>  | 128.13 ± 21.97             | 121.00 ± 20.00             | 131.00 ± 29.97             | 106.00 ± 10.72 <sup>b</sup> |
| QTC           | 196.25 ± 22.93 | 278.29 ± 25.72 <sup>a</sup> | 229.75 ± 39.95             | 235.77 ± 26.42             | 233.25 ± 36.24             | 205.13 ± 18.53 <sup>b</sup> |
| Waves (mV)    |                |                             |                            |                            |                            |                             |
| P             | 0.06 ± 0.03    | 0.05 ± 0.03                 | 0.04 ± 0.03                | 0.07 ± 0.03                | 0.06 ± 0.02                | 0.05 ± 0.02                 |
| Q             | -0.04 ± 0.01   | -0.05 ± 0.02                | -0.03 ± 0.01               | -0.03 ± 0.01               | -0.04 ± 0.02               | -0.03 ± 0.01                |
| R             | 0.21 ± 0.08    | 0.19 ± 0.05                 | 0.22 ± 0.04                | 0.24 ± 0.06                | 0.25 ± 0.05                | 0.26 ± 0.06                 |
| S             | -0.02 ± 0.01   | -0.02 ± 0.01                | -0.02 ± 0.01               | -0.01 ± 0.01               | -0.03 ± 0.02               | -0.03 ± 0.02                |

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean) of 8 animals per group.

<sup>a</sup>*P* < .05 compared to the naive rats.

<sup>b</sup>Denotes *P* < .05 compared to the NC.

## CONCLUSION

The present study suggests that the ESAP has cardioprotective effects against ISO-induced MI in rats. The cardioprotective effects of the ESAP may be useful for preventing the occurrence of MI.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors confirm that the article has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship. Further confirms that the order of authors listed in the article has been approved by all.

## AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

## FUNDING INFORMATION

This research was funded by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil; No. 59/300.046/2015 and 71/700.135/2018) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil; No. 407685/2018–9).

## REFERENCES

- Coelho FC, Tirloni CAS, Marques, AAM, et al. Traditional plants used by remaining healers from the region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *J Religion Health* 2019; 58(2):572–588.
- Marques AAM, Lorenção BR, Romão PVM, et al. Ethnopharmacological investigation of the cardiovascular effects of the ethanol-soluble fraction of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke leaves in spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2021; 274:114077.
- Aguado MI, Nuñez MB, Bela AJ, et al. Caracterización físico-química y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). *Rev Mex Cienc Farm* 2013;44: 46–51.
- Marchetti L, Pellati F, Graziosi R, et al. Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2019;166:364–370.
- Carmona F, Coneglian FS, Batista, PA, et al. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Ethnopharmacol* 2019;242:112060.
- Helliön-Ibarrola MC, Ibarrola DA, Montalbetti Y, et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *Phytomedicine* 2008;15(6–7): 478–483.
- Mora S, Díaz-Véliz G, Millan R, et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82(2):373–378.
- Soares Machado M, Palma A, Pabelo LC, et al. Extract from *Aloysia polystachya* induces the cell death of colorectal cancer stem cells. *Nutr Cancer* 2020;72(6):1004–1017.
- Fogliarini CO, Garlet QI, Parodi TV, et al. Anesthesia of *Epinephelus marginatus* with essential oil of *Aloysia polystachya*: An approach on blood parameters. *An Acad Bras Ciênc* 2017;89: 445–456.
- Gleiser RM, Bonino MA, Zygodlo JA. Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2011;108(1):69–78.
- Guarnier LP, Romão PVM, Palozi RAC, et al. Development of a predictive model to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female rats. *Biomolecules* 2019;9(11):664.
- Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Kardiologia Polska (Polish Heart J)* 2015;73(12):1207–1294.
- Aydin S, Ugur K, Aydin S, et al. Biomarkers in acute myocardial infarction: Current perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 2019; 15:1–10.
- Campos-Navarro R, Scarpa GF. The cultural-bound disease “empacho” in Argentina. A comprehensive botanical-historical and ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2013; 148(2), 349–360.
- Flachskampf FA, Schmid M, Rost C, et al. Cardiac imaging after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2011;32(3):272–283.
- Zhang G, Kimura S, Nishiyama A, et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 2005;65(1):230–238.
- Kumaran KS, Prince PS. Preventive effect of caffeic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol-induced myocardial infarctioned rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2010;24(2), 115–122.
- Mann D, Kent R, Parsons B, et al. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992; 85(2):790–804.
- Grimm D, Elsner D, Schunkert H, et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: Role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1998;37(1):91–100.
- Murray D, Prabhu S, Chandrasekar B. Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* 2000;101(20):2338–2341.
- Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. *Biomed Pharmacother* 2017;94:1145–1166.
- Zeitouni M, Kerneis M, Lattuca B, et al. Do patients need life-long beta-blockers after an uncomplicated myocardial infarction? *Am J Cardiovasc Drugs* 2019;19(5):431–438.
- Murugesan M, Manju V. Luteolin promotes mitochondrial protection during acute and chronic periods of isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Egypt Heart J* 2013;65(4):319–327.
- Mehdizadeh R, Parizadeh MR, Khoeei AR, et al. Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16(1):56.
- Allawadhi P, Khurana A, Sayed N, et al. Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant-based approaches for intervention. *Phytother Res* 2018;32(10):1908–1932.



## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo identificou uma alternativa viável para induzir uma combinação de múltiplos fatores de risco cardiovascular em um modelo animal que se assemelha às condições evidenciadas em humanos. Ambos os modelos de hipertensão utilizados (2K1C e SHR), associados ao hipotireoidismo e dieta hiperlipídica, foram capazes de desenvolver significativa dislipidemia, estresse oxidativo e comprometimentos renais, vasculares e cardíacos que são sugestivos de DCV; mas o grupo SHR exibiu alterações fisiopatológicas mais significativas.

Na segunda etapa do projeto foram atestados os efeitos cardioprotetores do óleo essencial de *A. polystachya* utilizando o modelo de múltiplos fatores de risco cardiovascular validado na etapa 1. Os resultados evidenciaram a ausência de sinais de toxicidade frente à administração do óleo essencial, bem como a prevalência de  $\beta$ -mirceno, limoneno e carvona em sua composição fitoquímica. Além disso, o tratamento com o óleo essencial de *A. polystachya*, por 42 dias, preveniu as alterações renais, eletrocardiográficas e hemodinâmicas, mantendo níveis de PAS semelhantes aos encontrados nos animais naïve. Os dados obtidos nos permitem concluir que o óleo essencial de *A. polystachya* apresenta significativo efeito cardioprotetor, demonstrando o potencial da espécie como um protótipo para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico que pode ser utilizado como complemento no tratamento de diferentes doenças cardiovasculares.

**7 ANEXOS**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 9 de Outubro de 2020.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Validação da predição de um modelo associativo de hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose em ratos"**, registrada sob o protocolo de nº 10/2020, sob a responsabilidade de *Arquimedes Gasparotto Junior e Karyne Garcia Tafarelo Moreno* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 19/06/2020.

|                                |                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Finalidade</i>              | ( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica    |
| <i>Vigência da autorização</i> | 01/01/2021 a 01/03/2023                 |
| <i>Espécie/linhagem/raça</i>   | <i>Rattus norvegicus</i> / Wistar e SHR |
| <i>Nº de animais</i>           | 100 / 80 Wistar e 20 SHR                |
| <i>Peso/idade</i>              | 90 dias                                 |
| <i>Sexo</i>                    | Machos                                  |
| <i>Origem</i>                  | Biotério Central da UFGD                |

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA